

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2003 年 7 月 31 日 (31.07.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/062243 A1(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C07D 493/22, 311/86, 493/04, 493/08, 493/10, A61K 31/35, 31/352, A61P 9/10, 25/00, 25/14, 25/16, 25/28, 27/06, 43/00, C12P 17/18 // C07M 7:00

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/00567

(22) 国際出願日: 2003 年 1 月 22 日 (22.01.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-15216 2002 年 1 月 24 日 (24.01.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 住友製薬株式会社 (SUMITOMO PHARMACEUTICALS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒541-8510 大阪府 大阪市 中央区道修町 2 丁目 2-8 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 熊谷 和夫

(KUMAGAI, Kazuo) [JP/JP]; 〒669-1321 兵庫県 三田市 けやき台 3 丁目 53-6 Hyogo (JP). 細谷 宜生 (HOSOTANI, Nobuo) [JP/JP]; 〒662-0831 兵庫県 西宮市 丸橋町 4-15-322 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 五十部 穰 (ISOBE, Yutaka); 〒554-0022 大阪府 大阪市 此花区春日出中 3 丁目 1-9 8 住友製薬株式会社 知的財産部内 Osaka (JP).

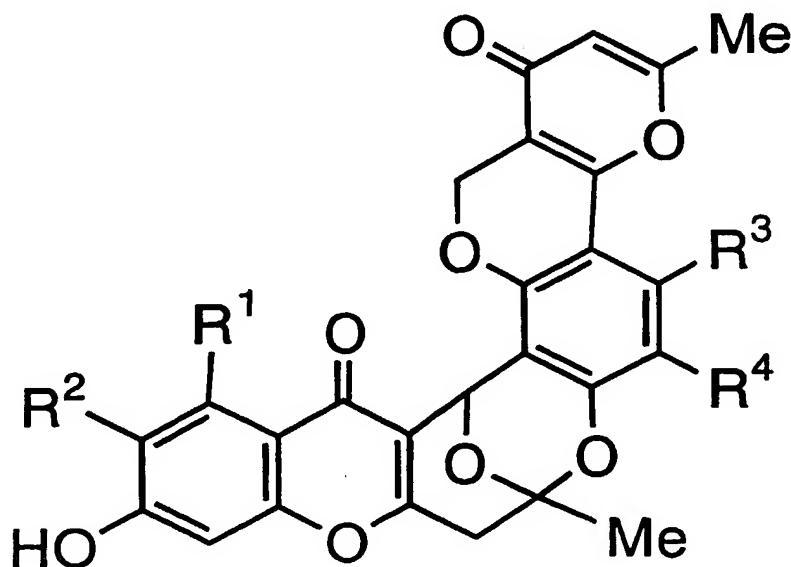
(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,

[続葉有]

(54) Title: NOVEL COMPOUNDS AS SEMAPHORIN INHIBITORS

(54) 発明の名称: セマフォリン阻害剤としての新規化合物



(1)

(57) Abstract: Compounds represented by the general formula (1) or pharmaceutically acceptable salts thereof, which exhibit semaphorin-inhibitory activity and are therefore useful as preventive or therapeutic agents for neuropathic or neurodegenerative diseases: (1) wherein R<sup>1</sup> and R<sup>3</sup> are each independently hydrogen or carboxyl; and R<sup>2</sup> and R<sup>4</sup> are each independently hydrogen or hydroxyl.

[続葉有]



GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI  
特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

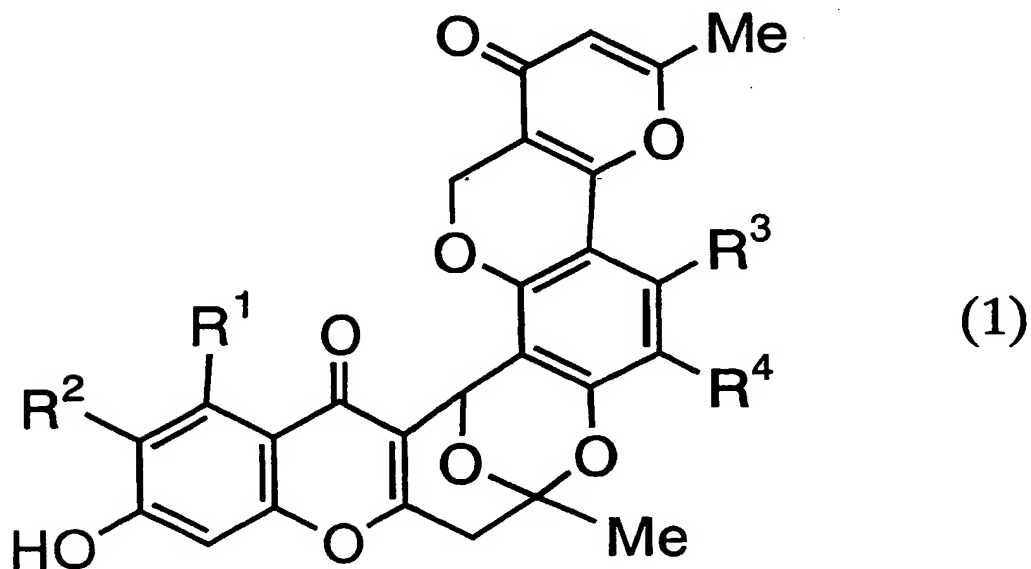
— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

下記一般式 (1)



(式中、R<sup>1</sup>およびR<sup>3</sup>は、独立して、水素原子またはカルボキシル基を表し、R<sup>2</sup>およびR<sup>4</sup>は、独立して、水素原子または水酸基を表す。)

で表される化合物、またはその薬学上許容される塩等で、神経傷害疾患や神経変性疾患の予防または治療剤として有用なセマフォリン阻害活性を有する化合物を提供する。

## 明細書

## セマフォリン阻害剤としての新規化合物

## 5 技術分野

本発明は、セマフォリン阻害活性を有する新規な化合物、該化合物の微生物学的製造方法、および該化合物を有効成分として含有する神経再生促進剤等に関する。

## 背景技術

- 10 神経細胞は成体において分裂能を持っていない特殊な組織である。そのため一旦障害を受けると長期にわたって障害が続く。特に脳や脊髄といった中枢神経系では全く再生能がない。脊髄損傷に代表される外因性の傷害やアルツハイマー病、パーキンソン病といった神経変性疾患に対する治療方法がないことも、中枢神経における再生能が無いことが一つの原因になっているといえることができる。他方、末梢神経は再生能を有しており、一旦切断された後も軸索が再生し機能が回復する。しかしこの場合にも再生に要する期間は数ヶ月から1年以上と非常に長時間を要し、患者にとっての苦痛は大きい。更にこのように再生に長期間を要するために、その間に神経細胞が死滅し機能回復に至らない場合も多い。このように再生能を有する末梢神経の場合も、脳や脊髄といった中枢神経系の環境では全く伸長することはできない。そのため、中枢
- 20 神経系には神経の伸長を阻止する物質が存在しているとされている。この中枢神経系に存在する神経再生阻害物質を抗体などで抑制すると一部ではあるが、中枢での神経再生が起こり、機能の回復も見られる。最近、この中枢神経再生阻害因子としてNogoが発見された (Nature 403, 434, 2000、Nature 403, 439, 2000)。しかし、Nogoを阻害することによって、再生する神経線維は一部であり、他の再生阻害物質が存在する
- 25 るのではないかと考えられているが、インビボで神経の再生阻害に働いている因子は、これまで明らかにされていない。

ところで、セマフォリンは、もともと発生期におけるバットの神経系形成に関係する因子としてその遺伝子が単離されたものであるが、その後、線虫、魚、哺乳類さらにはある種のウイルスなどにも分布する大きな遺伝子ファミリーを形成していることが報告され、現在ではセマフォリン遺伝子は構造上8つの遺伝子サブファミリー、クラス、に分類されている (Cell 97, 551, 1999)。セマフォリンは神経成長円錐を退縮させ軸索の伸長を抑制する因子として同定された内因性のタンパク質であり、これまでに約20種の分子種が知られている (Cell 97, 551, 1999) が、多くのセマフォリンファミリーの大部分の機能について詳しいことはわかっていない。最も良く研究されているのがクラス3型と呼ばれるサブファミリーの遺伝子群であり、これらの翻訳産物はすべて分泌型蛋白質である。これらの遺伝子がコードする蛋白質はインビトロで強い神経突起伸長抑制活性、成長円錐退縮活性を有していることが知られているが、ある条件下では神経突起伸長に誘引的に作用するとの報告もある。中でも最も良く研究されているのがセマフォリン3A (Sema 3A) (Cell 75, 217, 1993, Cell 75, 1389, 1993) であり、この蛋白は10 pMという低濃度で短時間のうちに培養神経細胞の成長円錐退縮を誘発する。セマフォリンのインビボでの機能を解析する研究として、Sema 3Aの受容体の一つのコンポーネントであるニューロピリン-1のノックアウトマウスの研究がなされている (Neuron 19, 995, 1997)。当該ノックアウトマウスは胎生致死であるが、三叉神経など一部の神経系の走行異常、血管形成異常が起こることが知られている。一方、Sema 3Aのノックアウトマウスでも同様の神経系の走行異常は認められるが、大きな異常も無く成体にまで発育する個体もあるとされており、生体内でのSema 3Aの機能については未だ不明な点も多い。

その他セマフォリンに関しては、セマフォリンW、セマフォリンY、セマフォリンZに対する抗体等のアンタゴニストやアンチセンスヌクレオチドを中枢神経の再生促進剤とすること (W098/15628, W098/11216, W098/20928) や、神経細胞とヒトコラプシンに特異的に結合する抗体とを接触させることにより、神経突起成長を誘導する方法 (米国特許第5416197号明細書) が知られている。しかし、セマフォリンを

特異的に阻害する低分子化合物は、これまで全く知られていなかった。

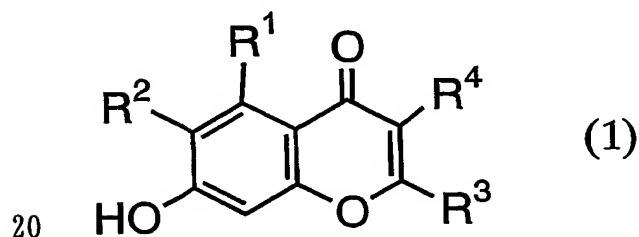
### 発明の開示

5 本発明の課題は、セマフォリン阻害活性を有する新規な化合物、該化合物の微生物学的製造方法、および該化合物を有効成分として含有する神経再生促進剤等を提供することにある。

セマフォリンは多くの作用を有していると考えられ、一部ではセマフォリンが神経の発生のみでなく再生にも関与しているとの考えもあったが、実際のところは全くわかっていなかった。本発明者らは、ペニシリウム・エスピー (Penicillium sp.)  
10 SPF-3059株の培養物中に見い出される化合物、SPF-3059-1等がセマフォリン阻害活性を有することを見い出すとともに、該化合物が、インビボにおいて、神経再生を促進することを明らかにした。更に、SPF-3059株の培養物を単離精製し、インビトロでセマフォリンの活性を阻害する物質をスクリーニング  
15 することによって、セマフォリン阻害活性を有する新規な化合物を見い出した。本発明は、上記の知見に基づいて、完成するに至ったものである。

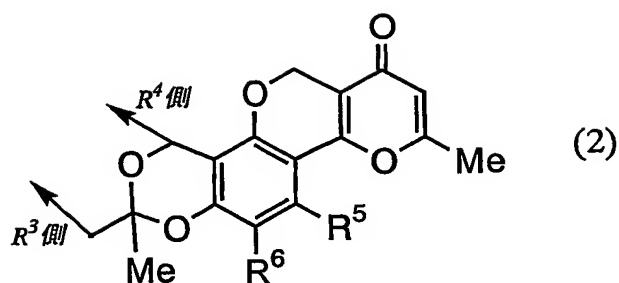
すなわち、本発明は、

[1] 一般式(1)で表される化合物、またはその薬学上許容される塩。



[式中、R<sup>1</sup>は水素原子またはカルボキシル基を表し、R<sup>2</sup>は水素原子または水酸基を表し、R<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>は以下の [I] ~ [IX] のいずれかを表す。

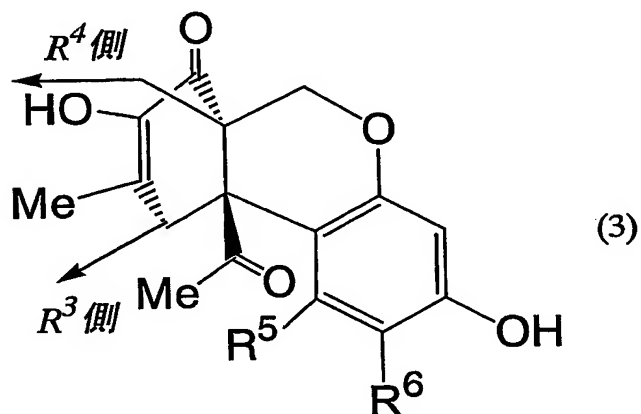
[I] R<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>は結合して、式(2)：



(式中、 $R^5$ は水素原子またはカルボキシル基を表し、 $R^6$ は水素原子または水酸基を表す。)

で表される2価基を表す。

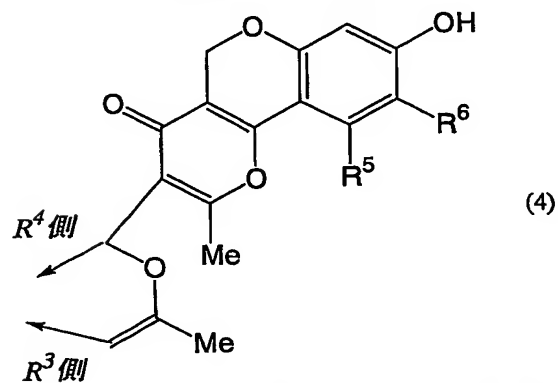
5 [II]  $R^3$ および $R^4$ は結合して、式(3)：



(式中、 $R^5$ および $R^6$ は前記と同義である。)

で表される2価基を表す。

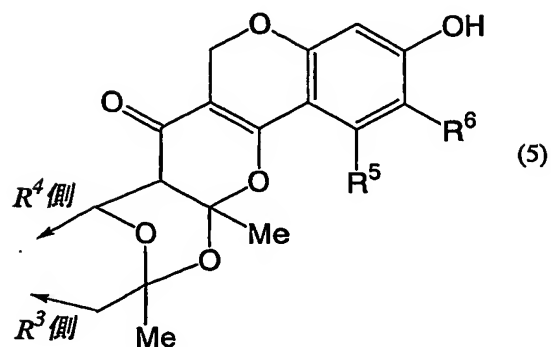
[III]  $R^3$ および $R^4$ は結合して、式(4)：



(式中、 $R^5$ および $R^6$ は前記と同義である。)

で表される2価基を表す。

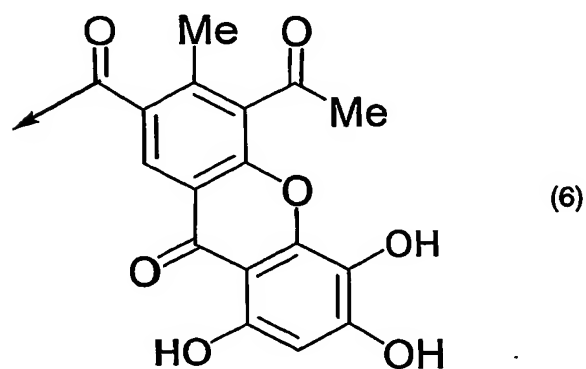
[IV]  $R^3$ および $R^4$ は結合して、式(5)：



[式中、 $R^5$ および $R^6$ は前記と同義である。]

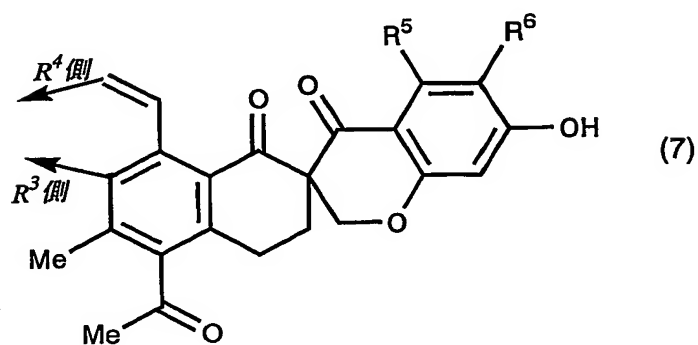
で表される2価基を表す。

5 [V]  $R^3$ は水素原子を表し、 $R^4$ は式(6)：



で表される基を表す。

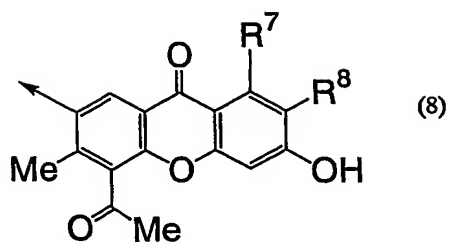
[VI]  $R^3$ および $R^4$ は結合して、式(7)：



10 (式中、 $R^5$ および $R^6$ は前記と同義である。)

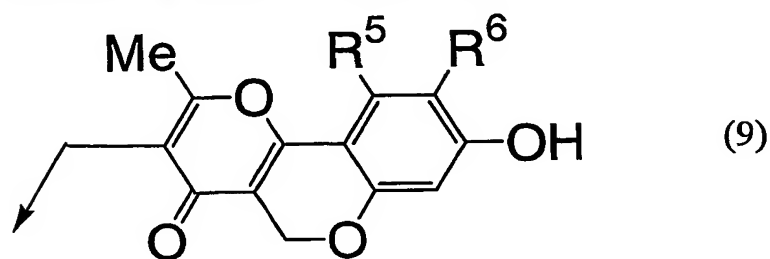
で表される2価基を表す。

[VII]  $R^3$ は式(8)：



(式中、 $R^7$ は水素原子またはカルボキシ基を表し、 $R^8$ は水素原子または水酸基を表す。)

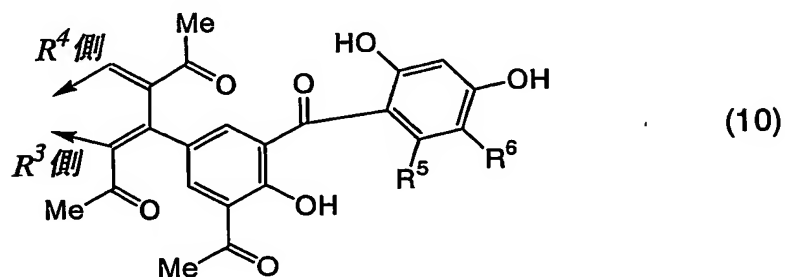
で表される基を表し、 $R^4$ は式(9)：



(式中、 $R^5$ 及び $R^6$ は前記と同義である。)

で表される基を表す。

[VIII]  $R^3$ および $R^4$ は結合して、式(10)：

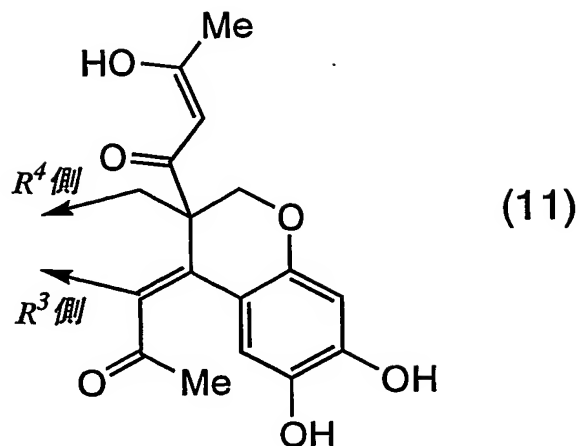


(式中、 $R^5$ および $R^6$ は前記と同義である。)

で表される2価基を表す。

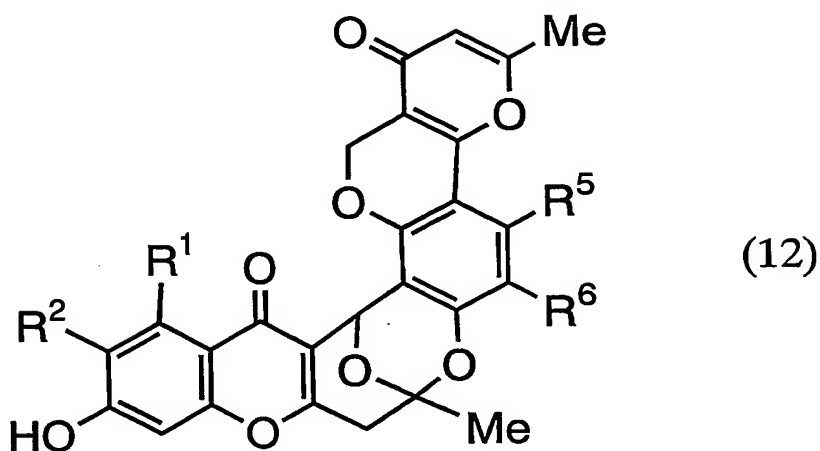
[IX]  $R^3$ および $R^4$ は結合して、式(11)：





で表される2価基を表す。]

[2] 一般式(12) :



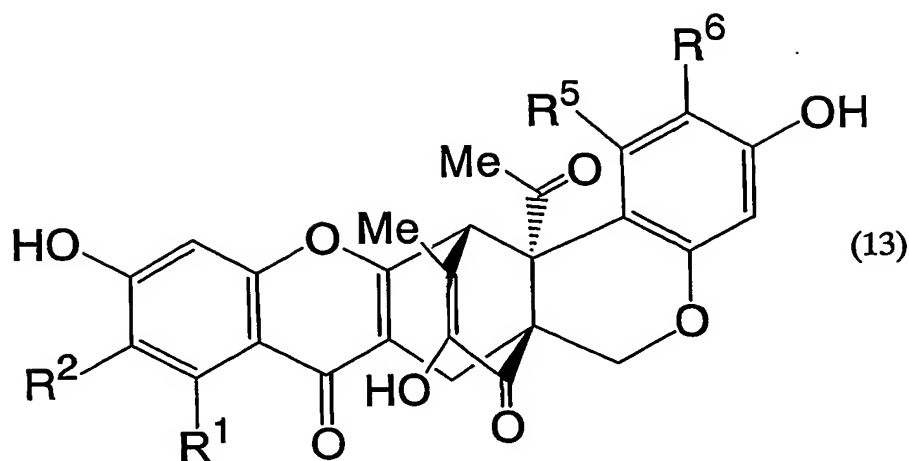
(式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$ および $R^6$ は、上記[1]と同義である。)

で表される、上記[1]記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

[3] 一般式(12)において、 $R^1$ および $R^5$ が、カルボキシ基であり、 $R^2$ が水酸基又は水素原子であり、 $R^6$ が水酸基である、上記[2]記載の化合物、または

その薬学上許容される塩。

[4] 一般式(13) :

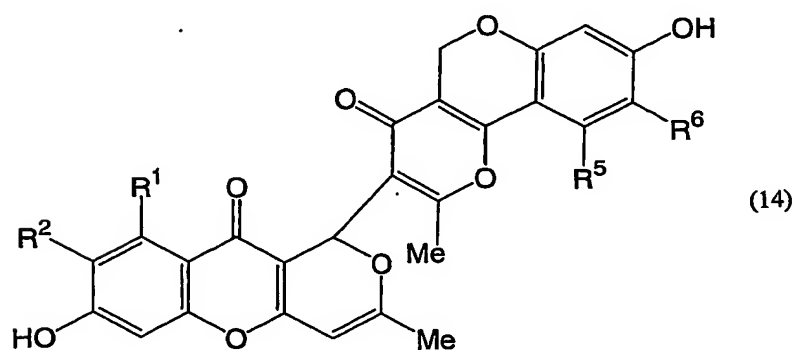


(式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$ および $R^6$ は上記〔1〕と同義である。)

で表される、上記〔1〕記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

〔5〕 一般式(13)において、 $R^1$ および $R^5$ がカルボキシル基であり、 $R^2$ および $R^6$ が水酸基である、上記〔4〕記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

〔6〕 一般式(14)：

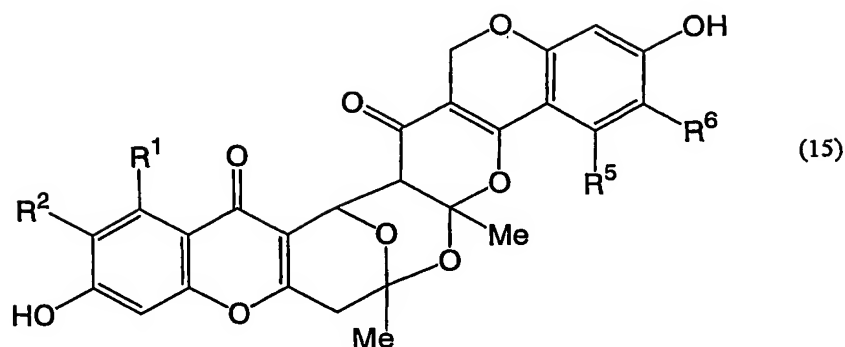


[式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$ および $R^6$ は上記〔1〕と同義である。]

10 で表される上記〔1〕記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

〔7〕 一般式(14)において、 $R^1$ および $R^5$ がカルボキシル基であり、 $R^2$ および $R^6$ が水酸基である、上記〔6〕記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

〔8〕 一般式(15)：

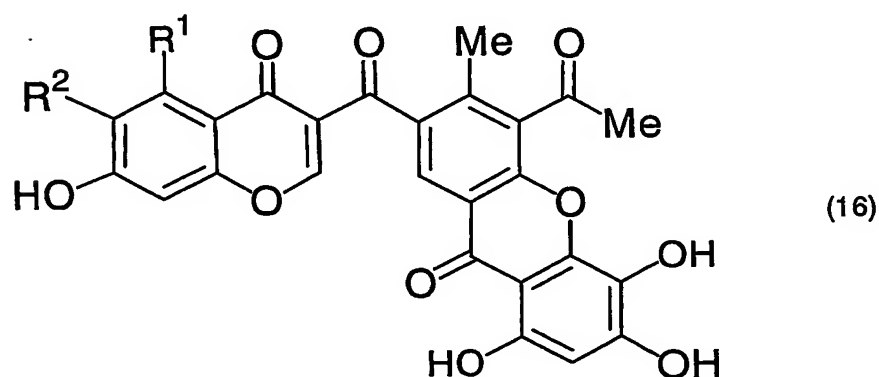


(式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$ および $R^6$ は上記〔1〕と同義である。)

で表される上記〔１〕記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

5 [9] 一般式(15)において、 $R^1$ および $R^5$ がカルボキシ基であり、 $R^2$ および $R^6$ が水酸基である、上記[8]記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

[1 0] 一般式 (1 6) :

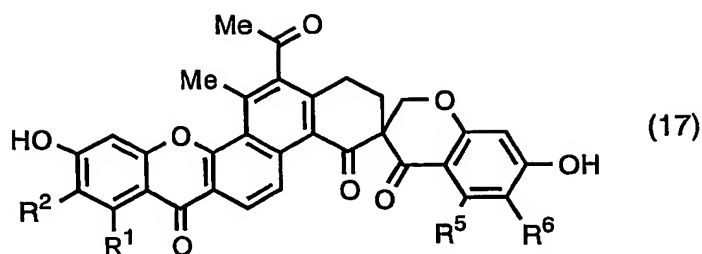


(式中、 $R^1$ および $R^2$ は上記〔1〕と同義である。)

10 で表される上記〔１〕記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

[11] 一般式(16)において、 $R^1$ が、カルボキシ基を表し、 $R^2$ が、水酸基を表す上記[10]記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

[12] 一般式 (17) :

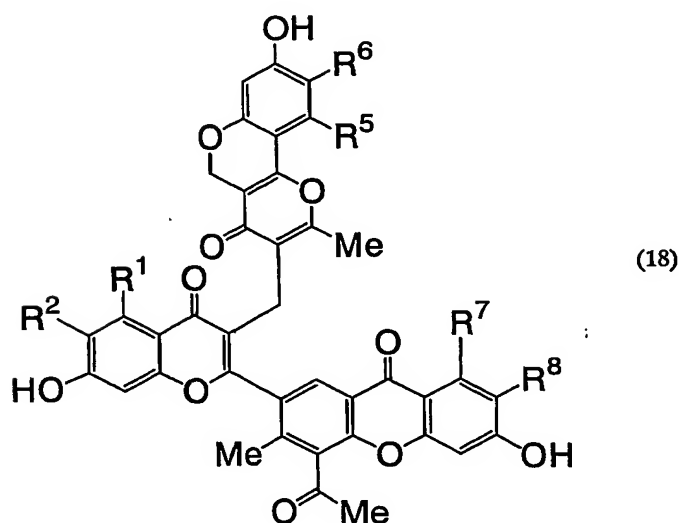


(式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$ 及び $R^6$ は、上記〔1〕と同義である。)

で表される上記〔1〕記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

〔13〕 一般式(17)において、 $R^1$ および $R^5$ がカルボキシ基を表し、 $R^2$ および $R^6$ が水酸基を表す、上記〔11〕記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

〔14〕 一般式(18)：



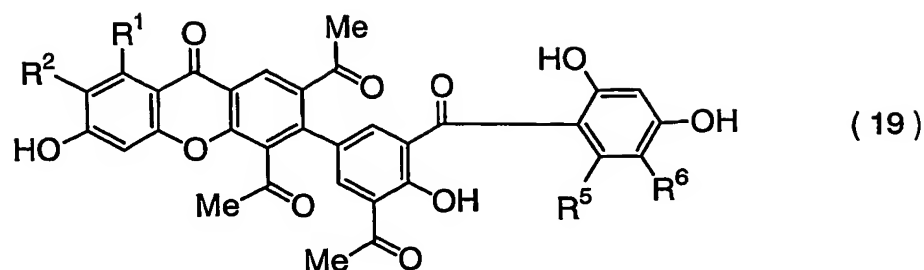
10 (式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ および $R^8$ は上記〔1〕と同義である。)

で表される上記〔1〕記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

〔15〕 一般式(18)において、 $R^1$ および $R^5$ はカルボキシ基であり、 $R^2$ 、 $R^6$ および $R^8$ が水酸基である、上記〔14〕記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

15 〔16〕 一般式(18)において、 $R^7$ が水素原子である、上記〔15〕記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

[17] 一般式(19) :



(式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>5</sup>およびR<sup>6</sup>は上記[1]と同義である。)

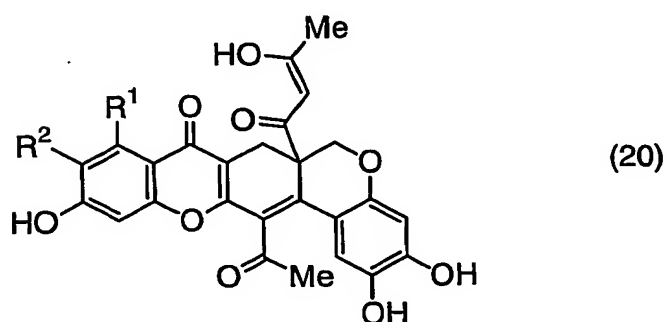
で表される上記[1]記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

5 [18] 一般式(19)において、R<sup>2</sup>およびR<sup>6</sup>が水酸基である、上記[17]記載の化合物、又はその薬学上許容される塩。

[19] 一般式(19)において、R<sup>5</sup>がカルボキシ基である、上記[18]記載の化合物、又はその薬学上許容される塩。

10 [20] 一般式(19)において、R<sup>1</sup>がカルボキシ基である、上記[19]記載の化合物、又はその薬学上許容される塩。

[21] 一般式(20) :



(式中、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、上記[1]と同義である。)

で表される上記[1]記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

15 [22] 一般式(20)において、R<sup>1</sup>がカルボキシ基であり、R<sup>2</sup>が水酸基である、上記[21]記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

[23] ペニシリウム属に属するSPF-3059株より得ることができ、下記の物理的性質および化学的性質を有し、かつセマフォリン阻害活性を有する化合物。

(a) 高速電子衝撃質量スペクトル $m/z$ 値  $(M+H)^+$ : 545;

(b) 分子式:  $C_{28}H_{16}O_{12}$ ;

(c) 紫外可視吸収スペクトル $\lambda_{max}$  (メタノール中) nm ( $\epsilon$ ): 213(41700)、286(29500)、338sh(14900)、429sh(6500);

5 (d) 赤外吸収スペクトル $\nu_{max}$  (KBr)  $cm^{-1}$ : 3358、3073、1700、1674、1631、1464、1276、1248;

(e)  $^1H$ 核磁気共鳴スペクトル(DMSO- $d_6$ 中、500 MHz): スペクトルのチャートを第1図に示す;

10 (f)  $^{13}C$ 核磁気共鳴スペクトル(DMSO- $d_6$ 中、125 MHz): スペクトルのチャートを第2図に示す;

[24] ペニシリウム属に属するSPF-3059株より得ることができ、下記の物理的性質および化学的性質を有し、かつセマフォリン阻害活性を有する化合物。

(a) 高速電子衝撃質量スペクトル $m/z$ 値  $(M+H)^+$ : 561;

(b) 分子式:  $C_{28}H_{16}O_{13}$ ;

15 (c) 紫外可視吸収スペクトル $\lambda_{max}$  (メタノール中) nm ( $\epsilon$ ): 219(34300)、257(28900)、311(28600)、404(14600)、450(14400);

(d) 赤外吸収スペクトル $\nu_{max}$  (KBr)  $cm^{-1}$ : 3154、1657、1605、1468、1279;

20 (e)  $^1H$ 核磁気共鳴スペクトル(DMSO- $d_6$ 中): スペクトルのチャートを第3図に示す;

(f)  $^{13}C$ 核磁気共鳴スペクトル(DMSO- $d_6$ 中): スペクトルのチャートを第4図に示す;

[25] ペニシリウム属に属するSPF-3059株より得ることができ、下記の物理的性質および化学的性質を有し、かつセマフォリン阻害活性を有する化合物。

25 (a) 高速電子衝撃質量スペクトル $m/z$ 値  $(M+H)^+$ : 669;

(b) 分子式:  $C_{34}H_{20}O_{15}$ ;

(c) 紫外可視吸収スペクトル $\lambda_{max}$  (メタノール中) nm ( $\epsilon$ ): 213(5460

0)、235sh(39400)、312(31300)、350(24200) ;

(d) 赤外吸収スペクトル  $\nu_{\max}$  (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  : 3348、1766、1707、1644、1588、1464、1301 ;

5 (e)  $^1\text{H}$ 核磁気共鳴スペクトル(DMSO-d<sub>6</sub>中、500MHz) : スペクトルのチャート  
トを第5図に示す ;

(f)  $^{13}\text{C}$ 核磁気共鳴スペクトル(DMSO-d<sub>6</sub>中、125MHz) : スペクトルのチャート  
トを第6図に示す ;

[26] ペニシリウム属に属するSPF-3059株より得ることができ、下記の物理的性質および化学的性質を有し、かつセマフォリン阻害活性を有する化合物。

10 (a) 高速電子衝撃質量スペクトル  $m/z$  値 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup> : 549 ;

(b) 分子式 :  $\text{C}_{28}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$  ;

(c) 紫外可視吸収スペクトル  $\lambda_{\max}$  (メタノール中) nm ( $\epsilon$ ) : 227(30200)、282sh(13500)、315(13900)、356(11000) ;

15 (d) 赤外吸収スペクトル  $\nu_{\max}$  (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  : 3396、1688、1662、1622、1470、1294 ;

(e)  $^1\text{H}$ 核磁気共鳴スペクトル(DMSO-d<sub>6</sub>中、500MHz) : スペクトルのチャート  
トを第7図に示す ;

(f)  $^{13}\text{C}$ 核磁気共鳴スペクトル(DMSO-d<sub>6</sub>中、125MHz) : スペクトルのチャート  
トを第8図に示す ;

20

[27] 上記[1] ~ [26] のいずれか記載の化合物、またはその薬学上許容される塩を有効成分として含有することを特徴とするセマフォリン阻害剤。

[28] セマフォリンが、クラス3型セマフォリンであることを特徴とする、上記[27] 記載のセマフォリン阻害剤。

25 [29] クラス3型セマフォリンが、セマフォリン3Aであることを特徴とする、上記[28] 記載のセマフォリン阻害剤。

[30] セマフォリンが、クラス6型セマフォリンであることを特徴とする、[2

7] 記載のセマフォリン阻害剤。

[3 1] クラス6型セマフォリンが、セマフォリン6 Cであることを特徴とする、上記[3 0] 記載のセマフォリン阻害剤。

5 [3 2] 上記[2 7] ~ [3 1] のいずれか記載のセマフォリン阻害剤を有効成分として含有することを特徴とする、神経伸長反発因子阻害剤。

[3 3] 上記[2 7] ~ [3 1] のいずれか記載のセマフォリン阻害剤を有効成分として含有することを特徴とする、成長円錐退縮活性及び／又はコラーゲンゲル中の神経伸長阻害活性の抑制作用を有する薬剤。

10 [3 4] 上記[2 7] ~ [3 1] のいずれか記載のセマフォリン阻害剤を有効成分として含有することを特徴とする、神経再生促進剤。

[3 5] 上記[2 7] ~ [3 1] のいずれか記載のセマフォリン阻害剤を有効成分として含有することを特徴とする神経障害疾患及び／又は神経変性疾患の予防若しくは治療剤。

15 [3 6] 上記[2 7] ~ [3 1] のいずれか記載のセマフォリン阻害剤を有効成分として含有することを特徴とする、脊髄神経の損傷及び／又は末梢神経の損傷を伴う疾患の予防若しくは治療剤。

20 [3 7] 上記[2 7] ~ [3 1] のいずれか記載のセマフォリン阻害剤を有効成分として含有することを特徴とする、嗅覚異常症、外傷性神経傷害、脳梗塞性神経障害、顔面神経麻痺、糖尿病性神経症、緑内障、網膜色素変性症、アルツハイマー病、パーキンソン病、神経変性疾患、筋発育不全性側索硬化症、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、脳梗塞、又は外傷性神経変性疾患の予防若しくは治療剤。

[3 8] ペニシリウム属に属する微生物を培養して、その培養物から化合物を採取することを特徴とする、上記[1] ~ [2 6] のいずれか記載の化合物、その薬学上またはその薬学上許容される塩の製造方法。

25 [3 9] ペニシリウム属に属する微生物が、ペニシリウム・エスピー (Penicillium sp.) S P F - 3 0 5 9 株であることを特徴とする上記[3 8] 記載の製造方法。



### 図面の簡単な説明

第1図は、SPF-3059-10の $^1\text{H}$ -NMRスペクトル(DMSO- $d_6$ )を示す図である。

第2図は、SPF-3059-10の $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトル(DMSO- $d_6$ )

5 を示す図である。

第3図は、SPF-3059-18の $^1\text{H}$ -NMRスペクトル(DMSO- $d_6$ )を示す図である。

第4図は、SPF-3059-18の $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトル(DMSO- $d_6$ )を示す図である。

10 第5図は、SPF-3059-31の $^1\text{H}$ -NMRスペクトル(DMSO- $d_6$ )を示す図である。

第6図は、SPF-3059-31の $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトル(DMSO- $d_6$ )を示す図である。

15 第7図は、SPF-3059-41の $^1\text{H}$ -NMRスペクトル(DMSO- $d_6$ )を示す図である。

第8図は、SPF-3059-41の $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトル(DMSO- $d_6$ )を示す図である。

### 発明を実施するための最良の形態

20 本発明において、セマフォリンとは、およそ500アミノ酸残基からなる類似構造のセマフォリンドメインを有する蛋白質の総称であり(Neuron 14, 941-948, 1995)、現在までに約20種以上が報告されているが、これら公知のセマフォリンに限定されるものではない。かかるセマフォリンとしては、ヒト等の哺乳類のセマフォリン、好ましくは文献(Cell 97, 551, 1999)において定義されたクラス3型、4型、5型

25 又は6型のセマフォリン、更に好ましくはクラス3型又はクラス6型セマフォリンを例示することができ、最も好ましくはクラス3型セマフォリンにおいてはセマフォリン3A(Cell 75, 217, 1993, Cell 75, 1389, 1993)を、またクラス6型セマフォリ

ンにおいてはセマフォリン 6 C (国際公開第98/11216号パンフレット、Moll.Cell.Neurosci.13, 9-23(1999)) を例示することができる。これらセマフォリンをコードする遺伝子の配列情報は、GenBankデータベースや前記文献等において公開されている。

また、本発明におけるセマフォリンには、天然型・組換え型のタンパク質に限ることなく、膜結合型セマフォリンの細胞外ドメインのみを発現可溶化させたもの、抗体やアルカリホスファターゼなどの他のタンパク質との融合タンパク質、あるいはヒスタグやフラグなどのタグを付けたもの、さらには一部のアミノ酸を欠失、置換、付加させた変異体なども含まれる。

- 10      例えば、セマフォリン 6 C (S e m a 6 C) は膜結合型タンパク質であり、S e m a 6 Cの有する活性の促進・抑制作用を利用して阻害剤の活性を測定する場合等においては、通常S e m a 6 Cの細胞外ドメインが使用される。S e m a 6 Cの細胞外ドメインには2つのアイソフォームが知られているが(国際公開第98/11216号パンフレット及びMoll.Cell.Neurosci.13, 9-23(1999))、そのいずれも成長円錐退縮活性を有している。かかるS e m a 6 Cの細胞外ドメインと、マーカートンパク質及び／又はペプチドタグとを結合させた融合タンパク質も、S e m a 6 C活性を損なわない限り、被験物質の活性を測定する場合等において有利に用いることができ、マーカートン
- 15      10      20      25      30      35      40      45      50      55      60      65      70      75      80      85      90      95      100      105      110      115      120      125      130      135      140      145      150      155      160      165      170      175      180      185      190      195      200      205      210      215      220      225      230      235      240      245      250      255      260      265      270      275      280      285      290      295      300      305      310      315      320      325      330      335      340      345      350      355      360      365      370      375      380      385      390      395      400      405      410      415      420      425      430      435      440      445      450      455      460      465      470      475      480      485      490      495      500      505      510      515      520      525      530      535      540      545      550      555      560      565      570      575      580      585      590      595      600      605      610      615      620      625      630      635      640      645      650      655      660      665      670      675      680      685      690      695      700      705      710      715      720      725      730      735      740      745      750      755      760      765      770      775      780      785      790      795      800      805      810      815      820      825      830      835      840      845      850      855      860      865      870      875      880      885      890      895      900      905      910      915      920      925      930      935      940      945      950      955      960      965      970      975      980      985      990      995      1000
- 20      マーカートンパク質としては、例えばアルカリホスファターゼ(Cell 63,185-194 (1990))、抗体のF c領域(Genbank accession number M87789)、HRPなどの従来よく知られた
- 25      マーカートンパク質を、またペプチドタグとしては、例えばミックタグ、ヒスタグ、フラグタグなどの従来よく知られたペプチドタグを挙げることができる。

また本発明においてセマフォリン阻害剤とは、上記セマフォリンのいずれかが有する活性、例えば、細胞の遊走活性、細胞死誘導活性、細胞の球状化や成長円錐の退縮

25      30      35      40      45      50      55      60      65      70      75      80      85      90      95      100      105      110      115      120      125      130      135      140      145      150      155      160      165      170      175      180      185      190      195      200      205      210      215      220      225      230      235      240      245      250      255      260      265      270      275      280      285      290      295      300      305      310      315      320      325      330      335      340      345      350      355      360      365      370      375      380      385      390      395      400      405      410      415      420      425      430      435      440      445      450      455      460      465      470      475      480      485      490      495      500      505      510      515      520      525      530      535      540      545      550      555      560      565      570      575      580      585      590      595      600      605      610      615      620      625      630      635      640      645      650      655      660      665      670      675      680      685      690      695      700      705      710      715      720      725      730      735      740      745      750      755      760      765      770      775      780      785      790      795      800      805      810      815      820      825      830      835      840      845      850      855      860      865      870      875      880      885      890      895      900      905      910      915      920      925      930      935      940      945      950      955      960      965      970      975      980      985      990      995      1000

25      といった細胞の形態変化、神経突起伸長抑制あるいは促進活性、神経細胞の樹状突起の伸長促進あるいは抑制活性、神経軸索ガイダンス活性などを阻害する物質をいい、かかるセマフォリン阻害剤としては、前記セマフォリン活性を阻害する物質であれば

特に制限されるものではないが、好ましくは中枢及び／又は末梢における神経再生促進作用を有する化合物、より好ましくはセマフォリンの有する成長円錐退縮活性及び／又はコラーゲンゲル中での神経伸長阻害活性の抑制作用を有する化合物、さらに好ましくはセマフォリンの有する成長円錐退縮活性とコラーゲンゲル中での神経伸長阻害活性の両方に対して抑制作用を有する化合物を挙げることができる。

中枢及び／又は末梢における神経再生促進作用とは、脳及び脊髄などからなる中枢組織、及び／又は該中枢組織以外の周辺・末梢部である体表や体内の諸器官である末梢組織における神経の再生を促進する作用を言う。ここで中枢における神経再生促進作用には、網膜神経や大脳皮質神経のような、中枢領域にある神経細胞体から軸索を出し同じく中枢領域にある他の神経細胞に投射する神経の再生促進作用のみならず、嗅神経、後根神経節感覚神経の中枢性線維等の、末梢に存在する神経細胞体から出る神経であっても、神経軸索が再生される環境が中枢組織であるときの神経再生促進作用も含まれる。また、末梢における神経再生促進作用としては、末梢にある神経細胞体から出て末梢組織の中を伸びる神経の再生促進作用のみならず、中枢領域（脳及び脊髄など）にある神経細胞体から出る神経であっても、再生される環境が末梢組織であるときの神経再生促進作用も含まれる。後者としては具体的に、脊髄運動神経、交感神経・副交感神経といった自律神経系の節前神経等の神経再生促進作用を例示することができる。また坐骨神経のように、前記の両方の神経を含む神経の再生促進作用も含まれる。そして、本発明のセマフォリン阻害剤としては、中枢及び末梢における神経再生促進作用を有する化合物が特に好ましい。なお、前記において中枢組織とは、脳、延髄、脊髄、眼などからなる組織で詳しくは血液脳関門・血液網膜関門といった構造によって高分子量物質の輸送が制限されている領域であり、末梢組織とは身体

のそれ以外の領域を指す。一般に、神経線維は末梢組織の中では再生が可能であるが、中枢組織の中では再生することができない。

上記セマフォリンの有する成長円錐退縮（コラプス）活性とは、神経細胞（通常は

神経節の組織片)をインビトロで所定時間培養し、伸長した神経突起とその神経突起先端の成長円錐を観察しうる状態にした後、所定の濃度(例えば、約3ユニット/ml;なお、1ユニット/mlは50%の成長円錐を退縮させるセマフォリンの濃度をいう)のセマフォリンを加えさらに所定時間(例えば1時間)培養を続けた後に観察される成長円錐を消失させる活性をいう。伸長した神経突起とその神経突起先端の成長円錐を観察しうる状態とするために、神経細胞のインビトロでの培養は通常10時間から20時間行われるが、神経の種類、培養条件によって適宜変更することができる。そして、例えばこの実験系において、セマフォリンを添加する約1時間前にあらかじめ適当濃度の化合物を加えておいた場合に、セマフォリンによる成長円錐の退縮が抑制されたとき、かかる化合物をセマフォリン阻害剤、特にセマフォリンの成長円錐退縮活性の抑制作用を有する化合物とすることができる。また、かかる成長円錐退縮活性の抑制作用を有する化合物としては特に制限されるものではないが、100  $\mu$ g/ml以下、好ましくは30  $\mu$ g/ml以下、より好ましくは10  $\mu$ g/ml以下、最も好ましくは3  $\mu$ g/ml以下の濃度で前記抑制作用を示すものを例示することができる。さらに、セマフォリン阻害剤としては、神経細胞やセマフォリン発現細胞等の細胞の増殖に実質的に影響を与えない化合物が、本発明のセマフォリン阻害剤の効果を確認する上で、また、医薬品として用いた場合の安全性の点で好ましい。

また上記セマフォリンの有するコラーゲンゲル中での神経伸長阻害活性とは、例えばセマフォリン産生細胞と神経細胞(通常は神経節)とを共に含むコラーゲンゲル中で観察される神経伸長阻害活性をいう。そして当該神経伸長阻害活性の抑制作用とは、コラーゲンゲル中でのセマフォリン活性を持続的に阻害する活性であり、例えばコラーゲンゲル中で神経細胞と近接してセマフォリン産生細胞を培養し、通常一晩以上経過した後には神経突起伸長を観察したときに、セマフォリン産生細胞と逆側へ伸長している神経突起に比べてセマフォリン産生細胞の方へは1/3以下しか伸長しない実験条件において、その物質存在下で培養すると1/2以上の長さまで伸長すること

のできる活性をいう。また、かかるコラーゲンゲル中での神経伸長阻害活性の抑制作用を有する化合物としては特に制限されるものではないが、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下、好ましくは $30\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下、より好ましくは $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下、最も好ましくは $3\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の濃度で前記抑制作用を示すものを例示することができる。

5

上記セマフォリンの2種類の活性測定において用いられるセマフォリンとしては、天然型のセマフォリンに限定されることなく、前記の膜結合型のセマフォリンの細胞外ドメインのみを発現可溶化させたもの、抗体やアルカリホスファターゼなどの他のタンパク質との融合タンパク質、あるいはヒスタグや、フラグなどのタグを付けたもの、一部のアミノ酸を変化させたものなども使用することができる。また、培養に用いる神経細胞としては、ニワトリ7日齢、8日齢の胎仔から取り出した後根神経節が便利であるが、ニワトリ以外の動物の後根神経節、また、後根神経節以外の交感神経節、網膜神経節、上頸神経節など、インビトロ培養下において神経突起を伸長する神経細胞であればどのような神経細胞でも用いることができる。培養条件としては、神経突起の伸長を観察でき、セマフォリンの活性が測定できる条件であれば、特に制限  
10  
15

本発明におけるセマフォリン阻害剤の作用機序は、以下のように考えられる。すなわち、セマフォリンの神経突起伸長抑制活性あるいは成長円錐退縮活性の発現は、まずセマフォリンが神経細胞表面（成長円錐）上のレセプターに結合することに始まる。セマフォリンの結合したレセプターから細胞内にシグナルが伝達され最終的にアクチン繊維の脱重合が惹起され、その結果として神経突起伸長抑制、成長円錐退縮が生じる。セマフォリン活性阻害はこれら一連の反応のいずれかの部分を阻害・遮断することで達成される。上記セマフォリンのレセプターとしては、前述のセマフォリンのいずれかのレセプターであればよく、セマフォリンが結合することができれば、その  
20  
25

改変体や、その一部のコンポーネントであってもよい。具体的には、ニューロピリン-1、プレキシシン（国際公開W001/405457）等が例示される。そして、本発明のセマ

フォリン阻害剤は、作用機序により限定されるものではなく、また上記の作用機序において、いずれの段階を阻害するものであっても本発明の範疇に含まれる。すなわち、上記セマフォリンのレセプター結合からアクチン繊維脱重合までに至る細胞内情報伝達に関わる反応を阻害することによりセマフォリン活性を阻害する化合物もまた、

5 本発明の範疇に含まれる。なお、セマフォリンのレセプター結合阻害活性を測定する方法としては、当業者により適宜選択される方法であればどのような方法であってもよく、例えば、前述の抗体やアルカリホスファターゼなどの他のタンパク質を融合したセマフォリン、あるいはヒスタグや、フラグなどのタグを付けたセマフォリンを、被験物質存在下において当該セマフォリンレセプターあるいはレセプターコンポーネ

10 ントを発現する細胞に対して結合させることで、セマフォリンのレセプター結合阻害活性を測定する方法を例示することができる。

前記一般式(1)及び(12)～(20)において、 $R^1$ は水素原子もしくはカルボキシル基を表し、好ましくはカルボキシル基を表す。また、 $R^2$ は水素原子もしくは水酸基を表し、好ましくは水酸基を表す。

15

前記一般式(1)、(12)～(15)、及び(17)～(19)において、 $R^5$ は水素原子もしくはカルボキシル基を表し、好ましくはカルボキシル基を表す。また、 $R^6$ は水素原子もしくは水酸基を表し、好ましくは水酸基を表す。

前記一般式(18)において、 $R^8$ は水素原子もしくは水酸基を表し、好ましくは水酸基を表す。

20

本発明のセマフォリン阻害剤を構成する化合物として、具体的には、後述する本件明細書実施例に記載された化合物を例示することができる。

前記一般式(1)、及び(12)～(20)のいずれかで表される化合物、または

25 その薬学上許容される塩は、本発明者らが大阪府内土壌より分離したペニシリウム属に属するカビ、ペニシリウム・エスピー(Penicillium sp.) SPF-3059株の培養物より、SPF-3059株の培養物からセマフォリン阻害活性を指標と

する等して、得ることができる。

該SPF-3059株は次のような菌学的性質を有する。

(a) 培養的・形態的性質

麦芽エキス寒天培地上で、コロニーの生育は遅く、25℃、21日で直径2.

- 5 8～2.9 cm、綿毛状を呈し、コロニー表面は白色又は黄色、コロニー裏面は濃い黄色であり、可溶性色素の産生及び孢子形成は認められない。ポテト・グルコース寒天培地上では、コロニーの生育は遅く、25℃、21日で直径3.2～3.3 cm、綿毛状を呈し、コロニー表面の色は白色又はクリーム色、コロニー裏面は濃い黄色又は黄褐色であり、可溶性色素の産生及び孢子形成は認められない。
- 10 ツアペック寒天培地上では、コロニーの生育は遅く、25℃、21日で直径3.1～3.2 cm、綿毛状を呈し、コロニー表面は白色又は灰色、コロニー裏面はクリーム色であり、可溶性色素の産生及び孢子形成は認められない。オートミール寒天培地（日本製薬製放線菌培地No.3「ダイゴ」）上では、コロニーの生育は遅く、25℃、21日で直径2.0～2.1 cm、綿毛状を呈し、コロニー
- 15 表面は白色、灰緑色又は黄色、コロニー裏面はクリーム色又は灰色であり、可溶性色素の産生は認められないが、分生孢子を形成する。分生子柄は平滑、長さ5～20 μmであり、分生子柄の先端に3～6個のフィアライドを単輪生する。フィアライドは長さ3～4 μmであり、その先端から分生子が2～10個の連鎖を形成する。分生子は球形で、直径2.2～2.4 μm、表面には縦に通常10本のしわがある。テレオモルフは認められない。
- 20

(b) 生理学的性質

①生育pH範囲

サブロープロス中、27℃、3日間の振盪培養における生育は次の通り。

25	pH	生育
	3.1	—
	4.5	+

	5. 5	++
	7. 1	+++
	8. 0	++
	9. 0	±
5	10. 0	—

## ②生育温度範囲

オートミール寒天培地上、38℃、5日間の培養で生育が認められる。

以上の菌学的性質より、本菌株をペニシリウム属に属する菌株であると同定し、ペニシリウム・エスピー (Penicillium sp.) S P F-3059と命名した。本  
10 菌株は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約に基づき、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号 F E R M B P-7663として寄託されている。

上記 S P F-3059 株の培養に使用される培地は液状でも固体でもよいが、  
15 通常は液体培地による振盪培養又は通気攪拌培養が有利である。使用する培地は、特に限定されるものではないが、炭素源としては、例えばグルコース、ショ糖、グリセリン、デンプン、デキストリン、糖蜜等が用いられ、また窒素源としては、例えばペプトン、カザミノ酸等の蛋白質加水分解物、肉エキス、酵母エキス、大豆粉、綿実粉、コーンステープリカー、ヒスチジン等のアミノ酸類等の有  
20 機窒素源や、アンモニウム塩や硝酸塩等の無機窒素源が用いられる。その他、浸透圧調整、pH調整、微量成分の補給等のために、各種リン酸塩、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、炭酸カルシウム等の無機塩類を添加することも可能である。さらに菌の生育を促進する目的で、各種ビタミン類、核酸関連化合物等を添加しても良い。なお、培養期間中に、シリコン油、ポリプロピレ  
25 ングリコール誘導体、大豆油等の消泡剤を添加することも可能である。そして、培養温度としては、好ましくは20～35℃の範囲、より好ましくは25～30℃の範囲の温度を上げることができ、培地のpHとして例えば、中性付近の範囲



を挙げることができ、培養期間としては例えば、5～10日間の範囲を例示することができる。

本発明の一般式(1)及び(12)～(20)のいずれかで表される化合物を  
5 培養液から単離・精製するには、微生物の生産する二次代謝物の培養物から、通常使用される単離・精製手段を用いることができる。培養液上清から目的物を単離・精製する場合は、培養濾液からの通常の単離・精製法、例えば溶媒抽出、イオン交換樹脂、吸着クロマトグラフィー、分配クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、薄層クロマトグラ  
10 ラフィー等を用いることができ、これらの単離・精製法は単独又は組み合わせて行うことができる。また、培養菌体から目的物を単離・精製する場合は、濾過又は遠心分離等の手段で集めた菌体を、アセトン、メタノール等の水溶性有機溶媒を用いて直接抽出することができ、抽出物は培養液上清からの単離・精製と同様の方法で、目的化合物を得ることができる。該目的化合物は、水、メタノール、  
15 エタノール、アセトン、酢酸エチル、クロロホルム、エーテル等の適当な溶媒を用いて、約1当量の塩基を作用させることによって、塩とすることもできる。

また、本発明のセマフォリン阻害剤を構成する化合物においては、それらの塩、好ましくは医薬的又は獣医薬的に許容される塩も本発明の範疇に含まれる。ここで、  
20 塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、アルミニウム塩、アンモニウム塩等の無機塩基塩や、トリエチルアンモニウム塩、トリエタノールアンモニウム塩、ピリジニウム塩、ジイソプロピルアンモニウム塩等の有機塩基塩や、アルギニン、リジン等の塩基性アミノ酸塩などを挙げることができる。

25 本発明の脊髄神経の損傷及び／又は末梢神経の損傷を伴う疾患を含む神経障害疾患及び／又は神経変性疾患の予防若しくは治療剤は、神経伸長反発因子阻害剤、特に上記セマフォリン阻害剤を有効成分とする前記の神経再生促進剤を含有するものであ

- れば特に制限されるものではないが、薬学的に許容される通常の担体、結合剤、安定化剤、賦形剤、希釈剤、pH緩衝剤、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、等張剤などの各種調剤用配合成分を添加することができる。またこれら予防若しくは治療剤は、経口的又は非経口的に投与することができる。すなわち通常用いられる投与
- 5 形態、例えば粉末、顆粒、カプセル剤、シロップ剤、懸濁液等の剤型で経口的に投与することができ、あるいは、例えば溶液、乳剤、懸濁液等の剤型にしたものを注射の型で非経口投与することができる他、スプレー剤の型で鼻孔内投与することもできる。
- 10 投与量及び投与回数は、投与法と患者の年齢、体重、病状等によって異なるが、病床部位に局所的に投与する方法が好ましい。神経の再生には通常数日から数ヶ月以上の期間を要するので、その間セマフォリンの活性を抑制するために1回又は2回以上投与することが好ましい。2回以上投与するときは連日あるいは適当な間隔をおいて繰り返し投与することが望ましい。投与量は一回当たりセマフォリン阻害剤とし
- 15 て数百 $\mu$ g～2g、好ましくは数十mg以下を用いることができ、投与回数を減らすために徐放性製剤を用いたり、オスモティックポンプなどで長期間にわたって少量ずつ投与することもできる。そして、これらのいずれの投与方法においても、作用部位においてセマフォリンの活性を十分に阻害する濃度になるような投与経路、投与方法を採用することが好ましい。
- 20 上記脊髄神経の損傷及び／又は末梢神経の損傷を伴う疾患を含む神経障害疾患及び／又は神経変性疾患としては、末梢神経や中枢神経の傷害、変性疾患、すなわち老化等に起因する嗅覚異常症、脊髄損傷などの外傷による嗅覚以外の神経傷害、脳梗塞などに起因する神経障害、顔面神経麻痺、糖尿病性神経症、緑内障、網膜色素変性症
- 25 、アルツハイマー病やパーキンソン病、ALSといった神経変性疾患、筋発育不全性側索硬化症、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、脳梗塞、外傷性神経変性疾患などを具体的に挙げるができる。さらに、受容体がニューロピリンである点

が共通である V E G F 1 6 5 が関与する血管新生を伴う疾患も、対象となる。

また、本発明の神経再生促進剤の用途は、神経障害疾患及び／又は神経変性疾患の  
予防若しくは治療剤等の医薬品に限定されることなく、動物薬、さらにはセマフォ  
5 リンシグナル阻害剤として産業上重要な実験試薬としても利用が可能である。本発明  
の神経再生促進剤はセマフォリン阻害剤を有効成分として含むことから、末梢神経で  
ある嗅神経の再生や、脳や脊髄の中の嗅球、大脳皮質、海馬、線条体、視床、間脳、  
中脳、小脳、橋、延髄、脊髄、網膜などにあって脳脊髄関門で区切られた領域である  
中枢内での神経の再生を促進する。

10

#### 実施例

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明の技術的範囲は  
これら実施例に限定されるものではない。

#### 15 実施例 1（本発明の化合物の製造）

グルコース 2 %、ショ糖 5 %、綿実粉 2 %、硝酸ナトリウム 0. 1 %、L-ヒ  
スチジン 0. 1 %、リン酸 2 カリウム 0. 0 5 %、塩化カリウム 0. 0 7 %、硫  
酸マグネシウム 7 水和物 0. 0 0 1 4 % を含み、pH 7. 0 に調整した培地 1 0  
m l を 5 0 m l 容の三角フラスコに分注しオートクレーブで滅菌した。これに斜  
20 面培養したペニシリウム・エスピー S P F - 3 0 5 9 株 ( F E R M B P - 7 6  
6 3 ) を 1 白金耳接種し、27℃、180 r p m にて 4 日間回転振盪培養して前  
々培養とした。500 m l 容三角フラスコ 5 本に上記と同じ組成の培地を 1 2 5  
m l ずつ分注しオートクレーブで滅菌した後、上記の前々培養液を 4 m l ずつ添  
加し、27℃、180 r p m にて 4 日間回転振盪培養して前培養とした。50リ  
25 ットル容ジャーフェーマンターに、グルコース 1. 4 3 %、ショ糖 3. 5 7 %、  
綿実粉 1. 4 3 %、硝酸ナトリウム 0. 0 7 %、L-ヒスチジン 0. 0 7 %、リ  
ン酸 2 カリウム 0. 0 3 6 %、塩化カリウム 0. 0 5 %、硫酸マグネシウム 7 水

和物 0.001%、アデカノールLG-295S（旭電化製消泡剤）0.01%  
を含み、pH 7.0に調整した培地を30リットル分注し、高圧蒸気滅菌（121℃、20分）した後、上記の前培養液を500ml添加し、27℃、400rpm、通気量15リットル／分にて9日間通気攪拌培養した。

5

培養終了後、培養液を10,000rpmにて10分間遠心分離して上清液と菌体に分離した。菌体画分を30リットルのアセトンで抽出し、濾過、濃縮後、水溶液となったところで10リットルの酢酸エチル-蟻酸（99：1）で2回抽出した。抽出液を減圧濃縮して粗抽出物130gを得た。これを200mlのメタノールに溶解し、Sephadex（登録商標）LH-20（アマシャムファルマシアバイオテク社）を用いるカラムクロマトグラフィーに付し、メタノールで溶出した。活性画分を集め、溶媒を減圧留去し、油状物91.4gを得た。これを200mlのメタノールに溶解し、TOYOPEARL（登録商標）HW-40F（東ソー）を用いるカラムクロマトグラフィーに付し、メタノールで溶出した。活性画分を集め、溶媒を減圧留去し、粗精製物41.9gを得た。これを500mgずつ2.5mlのジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解し、分取逆相HPLCに付した。分取逆相HPLCの条件は、カラム：Wakopak（登録商標）Wakosil-II5C18HGprep（φ5×10cmとφ5×25cmを連結、和光純薬工業製）、溶出液A：1%蟻酸水溶液、溶出液B：メタノール、グラジエント：B液割合45%から75%へ2時間の直線的グラジエント、流速：25ml／分、検出：260nmにおける吸光度、とし、溶出液を1分ずつ分取した。

15

上記分取した画分を分析用HPLCで分析した。分析用HPLCの条件は、カラム：Wakopak Wakosil-II5C18RS（φ4.6×150mm、和光純薬工業製）、溶出液A：1%蟻酸水溶液、溶出液B：メタノール、グラジエント：B液割合20%から67%へ71.1分間の直線的グラジエント、流

20

25

速：1. 3ml/分、検出：260nmにおける吸光度、とした。この分析用HPLCにおける保持時間を指標に分取用HPLCの溶出面分を集め、減圧下に溶媒を留去した後、再度分取用HPLCに付して上記と同様に精製し、さらにTOYOPEARL（登録商標）HW-40F（東ソー）を用いるカラムクロマト

5 グラフィーに付して上記と同様に精製し、溶媒を減圧留去、乾燥することにより、以下に示す精製品を得た。

表1

10	化合物	取得量(mg)	分析用HPLCでの保持時間(分)
	SPF-3059-8	11.1	51.2
	SPF-3059-10	3.3	54.8
	SPF-3059-16	6.7	41.5
15	SPF-3059-17	7.9	57.0
	SPF-3059-18	1.6	51.5
	SPF-3059-19	7.8	39.6
	SPF-3059-20	1.3	45.5
	SPF-3059-22	1.0	48.4
20	SPF-3059-23	16.7	33.2
	SPF-3059-31	6.5	49.6
	SPF-3059-38	4.0	63.1
	SPF-3059-40	2.3	53.7
	SPF-3059-41	1.0	54.0
25	SPF-3059-42	2.4	48.2

得られた化合物の物理化学的性状は次の通り。

(SPF-3059-8)

外観：クリーム色粉末

5 分子量：578

分子式： $C_{28}H_{18}O_{14}$

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS)  $m/z$  (positive) : 579 (M+H)<sup>+</sup>

10 高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS)  $m/z$  (negative) : 576 (M-H)<sup>-</sup>

高分解能高速電子衝撃質量スペクトル (HRFAB-MS)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup> :

実測値：579.0779

計算値：579.0775 ( $C_{28}H_{19}O_{14}$ )

15 紫外可視吸収スペクトル  $\lambda_{max}$  (メタノール中) nm ( $\epsilon$ ) :

220(45700)、305(18200)、358(16800)

赤外吸収スペクトル  $\nu_{max}$  (KBr)  $cm^{-1}$  :

3414、1652、1568、1464、1614、1289

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm :

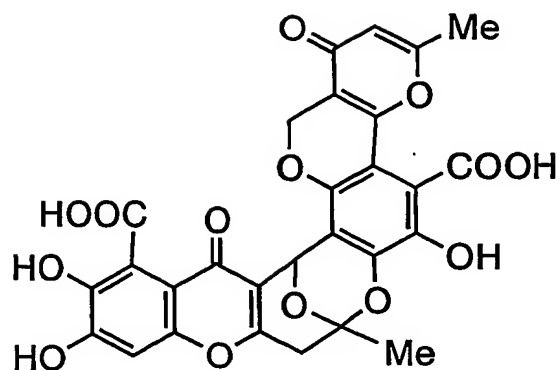
20 1.75(3H, s)、2.21(3H, s)、3.06(1H, d, 18.8)、3.41(1H, d, 18.8)、4.72(1H, d, 13.6)、5.02(1H, d, 13.6)、6.16(1H, s)、6.17(1H, s)、6.84(1H, s)

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm :

25 18.7、26.9、38.2、62.0、62.1、101.1、102.1、104.8、112.3、112.6、113.3、113.5、116.6、119.1、119.4、141.4、143.7(2C)、145.0、149.9、152.0、154.7、159.4、164.6、167.3、167.7、170.9、174.8

溶解性：水、ヘキサンに不溶、メタノール、DMSOに可溶

これらからSPF-3059-8の構造式を、次式と決定した。



(SPF-3059-10)

外観：黄色粉末

5 物質の性質：酸性物質

分子量：544

分子式： $C_{28}H_{16}O_{12}$

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS)  $m/z$  (positive) : 545 ( $M+H$ )<sup>+</sup>

10 高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS)  $m/z$  (negative) : 543 ( $M-H$ )<sup>-</sup>

高分解能高速電子衝撃質量スペクトル (HRFAB-MS)  $m/z$  ( $M+H$ )<sup>+</sup> :

実測値：545.0732

15 計算値：545.0740 ( $C_{28}H_{17}O_{12}$ )

紫外可視吸収スペクトル  $\lambda_{max}$  (メタノール中) nm ( $\epsilon$ ) :

213(41700)、286(29500)、338sh(14900)、429sh(6500)

赤外吸収スペクトル  $\nu_{max}$  (KBr)  $cm^{-1}$  :

3358、3073、1700、1674、1631、1464、1276、1248

20  $^1H$ -NMR スペクトル :

重ジメチルスルフォキシド ( $DMSO-d_6$ ) 中、500 MHz で測定したスペクトルを図1に示す。

$^{13}\text{C}$ —NMRスペクトル:

重ジメチルスルフォキシド ( $\text{DMSO}-d_6$ ) 中、125MHzで測定したスペクトルを図2に示す。

溶解性: 水、ヘキサンに不溶、メタノール、DMSOに可溶

5

(SPF-3059-16)

外観: クリーム色粉末

分子量: 580

分子式:  $\text{C}_{28}\text{H}_{20}\text{O}_{14}$

10 高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS)  $m/z$  (positive): 581 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS)  $m/z$  (negative): 579 ( $\text{M}-\text{H}$ )<sup>-</sup>

高分解能高速電子衝撃質量スペクトル (HRFAB-MS)  $m/z$  ( $\text{M}-\text{H}$ )<sup>-</sup>

15 :

実測値: 579.0812

計算値: 579.0776 ( $\text{C}_{28}\text{H}_{19}\text{O}_{14}$ )

紫外可視吸収スペクトル  $\lambda_{\text{max}}$  (メタノール中) nm ( $\epsilon$ ):

210(44500)、323(15000)、353sh(12000)

20 赤外吸収スペクトル  $\nu_{\text{max}}$  (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ :

3420、1694、1668、1634、1568、1464、1278

$^1\text{H}$ —NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  ppm:

1.88(3H, s)、2.08(3H, s)、2.28(1H, d, 16.6)、2.34(1H, d, 16.6)、4.07(1H, d, 10.1)、4.17(1H, s)、4.42(1H, d, 10.1)、6.29(1H, s)、6.93(1H, s)

25  $^{13}\text{C}$ —NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  ppm:

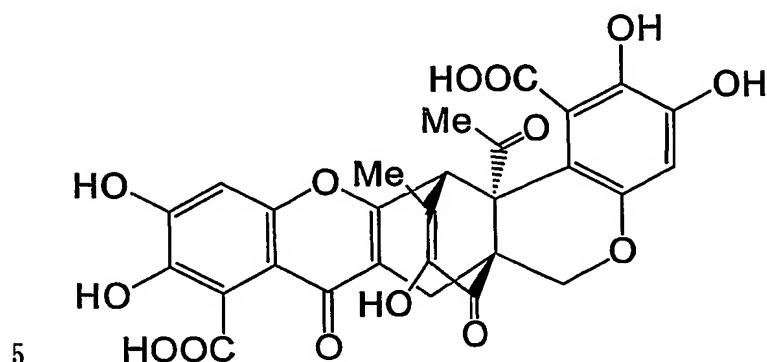
21.1、24.2、30.4、50.1、50.4、64.9、69.3、102.3、104.1、110.6、111.6、112、119.0、121.6、138.7、139.4、141.6、147.1、148.0、150.4、152.1、160.4、162.



6, 167.7, 171.3, 174.3, 198.6, 201.3

溶解性：水、ヘキサンに不溶、メタノール、DMSOに可溶

これらからSPF-3059-16の構造式を、次式と決定した（立体は相対立体配置）。



(SPF-3059-17)

外観：黄色粉末

分子量：578

10 分子式： $C_{28}H_{18}O_{14}$

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS)  $m/z$  (positive) : 579 ( $M+H$ )<sup>+</sup>

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS)  $m/z$  (negative) : 577 ( $M-H$ )<sup>-</sup>

15 高分解能高速電子衝撃質量スペクトル (HRFAB-MS)  $m/z$  ( $M-H$ )<sup>-</sup> :

実測値：577.0675

計算値：577.0619 ( $C_{28}H_{17}O_{14}$ )

紫外可視吸収スペクトル  $\lambda_{max}$  (メタノール中) nm ( $\epsilon$ ) :

20 214(49400), 301(8900), 390(22100)

赤外吸収スペクトル  $\nu_{max}$  (KBr)  $cm^{-1}$  :

3109, 1656, 1564, 1459, 1272

$^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm :

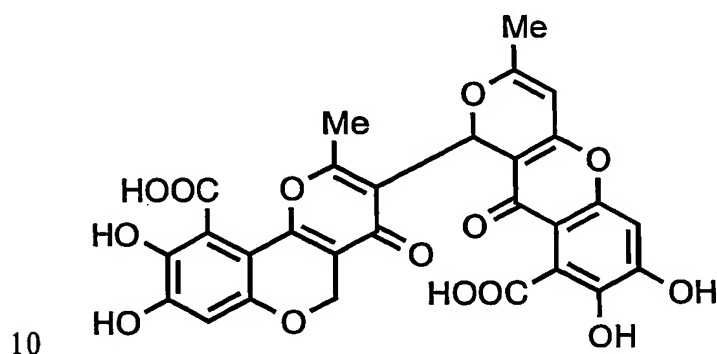
1.89 (3H, s)、2.46 (3H, s)、4.85 (1H, d, 13.3)、4.92 (1H, d, 13.3)、5.52 (1H, s)、6.42 (1H, s)、6.65 (1H, s)、6.88 (1H, s)

$^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm :

5 17.1、20.2、61.9、71.9、91.8、102.8、103.0 (2C)、103.5、111.0、112.6、117.6、119.2、122.9、139.4、143.3、149.2、150.4、151.2、151.7、154.4、159.1、163.4、165.6、167.8、168.6、170.9、172.9

溶解性：水、ヘキサンに不溶、メタノール、DMSOに可溶

これらからSPF-3059-17の構造式を、次式と決定した。



(SPF-3059-18)

外観：オレンジ色粉末

物質の性質：酸性物質

15 分子量：560

分子式： $\text{C}_{28}\text{H}_{16}\text{O}_{13}$

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS)  $m/z$  (positive) : 561 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>

20 高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS)  $m/z$  (negative) : 559 ( $\text{M}-\text{H}$ )<sup>-</sup>

高分解能高速電子衝撃質量スペクトル (HRFAB-MS)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup> :

実測値 : 561.0710

計算値 : 561.0670 ( $C_{28}H_{17}O_{13}$ )

紫外可視吸収スペクトル  $\lambda_{max}$  (メタノール中) nm ( $\epsilon$ ) :

219(34300)、257(28900)、311(28600)、404(14600)、450(14400) \

5 赤外吸収スペクトル  $\nu_{max}$  (KBr)  $cm^{-1}$  :

3154、1657、1605、1468、1279

$^1H$ -NMRスペクトル :

重ジメチルスルフォキシド ( $DMSO-d_6$ ) 中、500MHzで測定したスペクトルを図3に示す。

10  $^{13}C$ -NMRスペクトル :

重ジメチルスルフォキシド ( $DMSO-d_6$ ) 中、125MHzで測定したスペクトルを図4に示す。

溶解性 : 水、ヘキサンに不溶、メタノール、DMSOに可溶

15 (SPF-3059-19)

外観 : 黄色粉末

分子量 : 596

分子式 :  $C_{28}H_{20}O_{15}$

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS)  $m/z$  (positive) : 5

20 97 ( $M+H$ )<sup>+</sup>

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS)  $m/z$  (negative) : 5

95 ( $M-H$ )<sup>-</sup>

高分解能高速電子衝撃質量スペクトル (HRFAB-MS)  $m/z$  ( $M+H$ )<sup>+</sup>

:

25 実測値 : 597.0890

計算値 : 597.0881 ( $C_{28}H_{21}O_{15}$ )

紫外可視吸収スペクトル  $\lambda_{max}$  (メタノール中) nm ( $\epsilon$ ) :

204(34600)、225(30900)、267sh(8300)、319(17100)、349(13800)、404(10100)

赤外吸収スペクトル  $\nu_{\max}$  (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  :

3418、1634、1605、1462、1270

5  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  ppm :

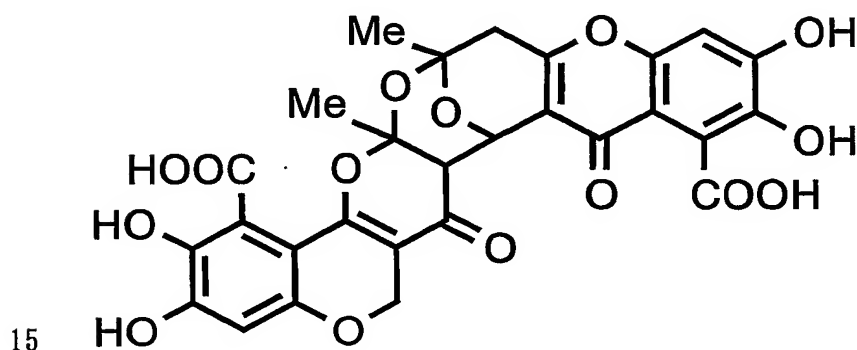
1.43(3H, s)、1.55(3H, s)、2.94(1H, d, 5.5)、3.17(1H, d, 18.6)、3.24(1H, d, 18.6)、4.38(1H, d, 11.9)、4.54(1H, d, 11.9)、5.27(1H, d, 5.5)、5.84(1H, s)、6.59(1H, s)

$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  ppm :

10 24.5、28.7、36.6、49.4、62.1、64.2、96.8、99.6、102.0、102.6、103.0、104.0、111.1、120.2(2C)、113.1、137.3、146.5、150.8、151.8、152.0、153.0、159.2、161.3、167.7、169.8、172.6、185.4

溶解性：水、ヘキサンに不溶、メタノール、DMSOに可溶

これらから SPF-3059-19 の構造式を、次式と決定した。



(SPF-3059-20)

外観：黄色粉末

分子量：562

20 分子式： $\text{C}_{28}\text{H}_{18}\text{O}_{13}$

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS)  $m/z$  (positive) : 5

63 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS)  $m/z$  (negative) : 561 (M-H)<sup>-</sup>

高分解能高速電子衝撃質量スペクトル (HRFAB-MS)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup> :

5 実測値 : 563.0882

計算値 : 563.0826 (C<sub>28</sub>H<sub>19</sub>O<sub>13</sub>)

紫外可視吸収スペクトル  $\lambda_{max}$  (メタノール中) nm ( $\epsilon$ ) :

216(49100)、301(21700)、369(14200)

赤外吸収スペクトル  $\nu_{max}$  (KBr) cm<sup>-1</sup> :

10 3444、3069、1690、1649、1619、1536、1435、1283

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm :

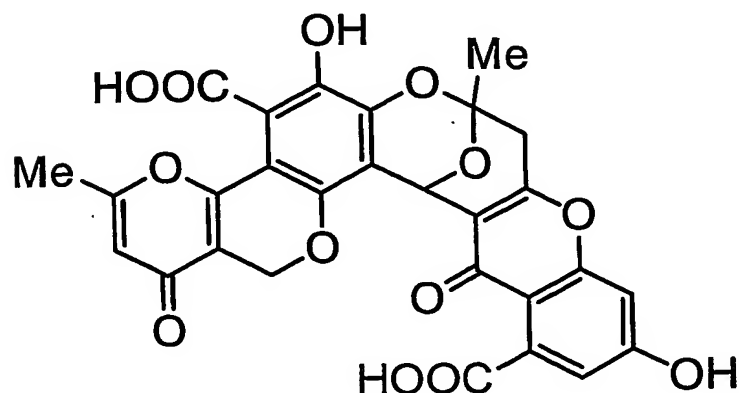
1.76(3H, s), 2.21(3H, s), 3.09(1H, d, 18.8), 3.43(1H, d, 18.8), 4.75(1H, d, 13.4), 5.03(1H, d, 13.4), 6.17(1H, s), 6.18(1H, s), 6.75(1H, d, 2.1), 6.83(1H, d, 2.1)

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm :

15 18.7, 27.0, 38.3, 61.8, 62.2, 101.0, 102.9, 104.8, 112.3, 112.7, 113.1, 113.3, 113.4, 117.4, 119.2, 136.3, 141.1, 143.7, 145.1, 154.7, 156.9, 160.2, 161.9, 164.7, 167.3, 169.3, 170.8, 174.9

溶解性 : 水、ヘキサンに不溶、メタノール、DMSOに可溶

これらからSPF-3059-20の構造式を、次式と決定した。



(SPF-3059-22)

外観：クリーム色粉末

分子量：548

分子式： $C_{27}H_{16}O_{13}$

5 高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS)  $m/z$  (positive) : 549 (M+H)<sup>+</sup>

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS)  $m/z$  (negative) : 547 (M-H)<sup>-</sup>

10 高分解能高速電子衝撃質量スペクトル (HRFAB-MS)  $m/z$  (M-H)<sup>-</sup> :

実測値 : 547.0568

計算値 : 547.0513 ( $C_{27}H_{15}O_{13}$ )

紫外可視吸収スペクトル  $\lambda_{max}$  (メタノール中) nm ( $\epsilon$ ) :

208(51900)、240sh(43900)、270sh(38000)、310(30700)、387(18000)

15 赤外吸収スペクトル  $\nu_{max}$  (KBr)  $cm^{-1}$  :

3410、3068、1655、1619、1599、1561、1460、1310、1251

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm :

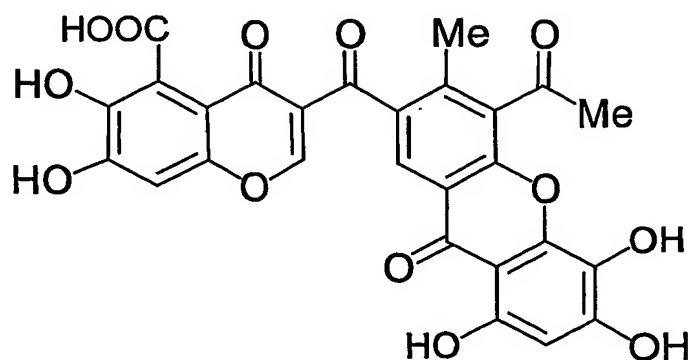
2.34(3H, s)、2.73(3H, s)、6.31(1H, s)、6.98(1H, s)、8.08(1H, s)、8.69(1H, s)

20 <sup>13</sup>C-NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm :

17.1、32.3、98.1、101.8、102.6、113.3、117.1、119.8、123.2、125.4、126.1、31.9、136.2、140.4、142.1、144.7、150.4、152.7、152.9、154.8、156.2、160.4、167.1、172.1、178.9、192.7、202.4

溶解性：水、ヘキサンに不溶、メタノール、DMSOに可溶

25 これらから SPF-3059-22 の構造式を、次式と決定した。



(SPF-3059-23)

外観：黄色粉末

5 分子量：686

分子式： $C_{34}H_{22}O_{16}$

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS)  $m/z$  (positive) : 687 ( $M+H$ )<sup>+</sup>

10 高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS)  $m/z$  (negative) : 685 ( $M-H$ )<sup>-</sup>

高分解能高速電子衝撃質量スペクトル (HRFAB-MS)  $m/z$  ( $M-H$ )<sup>-</sup> :

実測値：685.0887

計算値：685.0830 ( $C_{34}H_{21}O_{16}$ )

15 紫外可視吸収スペクトル  $\lambda_{max}$  (メタノール中) nm ( $\epsilon$ ) :

213(53800)、282sh(24100)、324(21700)

赤外吸収スペクトル  $\nu_{max}$  (KBr)  $cm^{-1}$  :

3354、1688、1588、1468、1288

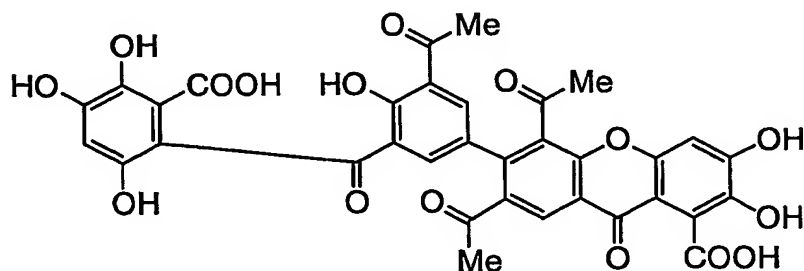
<sup>1</sup>H-NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm :

20 2.14(3H, s), 2.21(3H, s), 2.61(3H, brs), 6.50(1H, s), 6.85(1H, s), 7.28(1H, brs), 7.68(1H, brs), 8.29(1H, s)

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm :

30.2, 31.3, 32.3, 102.4, 107.3, 110.0, 114.7, 114.9, 119.7, 120.5, 123.8,  
125.9, 126.4, 126.5, 132.6, 135.6, 136.1, 136.7, 139.5, 141.0, 143.4, 145.6,  
147.8, 150.4, 151.8, 154.1, 160.5, 167.5, 170.5, 172.7, 197.9, 200.4, 201.2,  
202.0

- 5 溶解性：水、ヘキサンに不溶、メタノール、DMSOに可溶  
これらからSPF-3059-23の構造式を、次式と決定した。



(SPF-3059-31)

- 10 外観：黄色粉末  
物質の性質：酸性物質  
分子量：668  
分子式：C<sub>34</sub>H<sub>20</sub>O<sub>15</sub>  
高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (positive) : 6  
15 69 (M+H)<sup>+</sup>  
高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (negative) : 6  
67 (M-H)<sup>-</sup>  
高分解能高速電子衝撃質量スペクトル (HRFAB-MS) m/z (M+H)<sup>+</sup>  
:

20 実測値：669.0887

計算値：669.0881 (C<sub>34</sub>H<sub>21</sub>O<sub>15</sub>)

紫外可視吸収スペクトル λ<sub>max</sub> (メタノール中) nm (ε) :

213(54600)、235sh(39400)、312(31300)、350(24200)



赤外吸収スペクトル  $\nu_{\max}$  (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  :

3348、1766、1707、1644、1588、1464、1301

$^1\text{H}$ -NMR スペクトル :

重ジメチルスルフォキシド ( $\text{DMSO}-d_6$ ) 中、500 MHz で測定したスペクトルを図5に示す。

$^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル :

重ジメチルスルフォキシド ( $\text{DMSO}-d_6$ ) 中、125 MHz で測定したスペクトルを図6に示す。

溶解性 : 水、ヘキサンに不溶、メタノール、DMSOに可溶

(SPF-3059-38)

外観 : 黄色粉末

分子量 : 654

分子式 :  $\text{C}_{34}\text{H}_{22}\text{O}_{14}$

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS)  $m/z$  (positive) : 655 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS)  $m/z$  (negative) : 653 ( $\text{M}-\text{H}$ )<sup>-</sup>

高分解能高速電子衝撃質量スペクトル (HRFAB-MS)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>

実測値 : 655.1100

計算値 : 655.1088 ( $\text{C}_{34}\text{H}_{23}\text{O}_{14}$ )

紫外可視吸収スペクトル  $\lambda_{\max}$  (メタノール中) nm ( $\epsilon$ ) :

212(41100)、239sh(34000)、287(22200)、300sh(21900)、328(24400)

赤外吸収スペクトル  $\nu_{\max}$  (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  :

3418、1696、1660、1607、1471、1283

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  ppm :

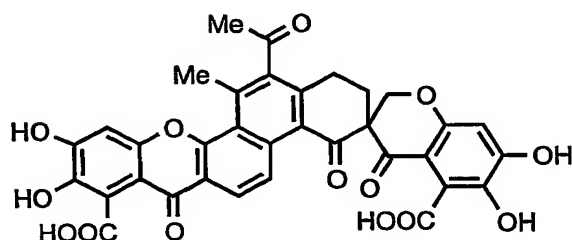
2.30 (1H, m)、2.36 (1H, m)、2.65 (3H, s)、2.81 (1H, m)、2.96 (1H, m)、3.00 (3H, s)、4.56 (1H, d, 11.8)、4.75 (1H, d, 11.8)、6.43 (1H, s)、7.07 (1H, s)、8.15 (1H, d, 9.2)、8.73 (1H, d, 9.2)

$^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm:

5 21.7、23.3、26.6、32.9、56.9、71.3、102.3、102.5、107.9、110.2、117.4、119.4、121.2、122.22、122.24、124.0、127.1、134.3、136.1、138.1、141.7、141.8、142.1、150.1、154.0、154.1、154.6、155.6、167.7、167.9、173.1、189.5、197.5、207.2

溶解性：水、ヘキサンに不溶、メタノール、DMSOに可溶

10 これらから SPF-3059-38 の構造式を、次式と決定した。



(SPF-3059-40)

外観：オレンジ色粉末

15 分子量：536

分子式： $\text{C}_{27}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS)  $m/z$  (positive) : 537 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS)  $m/z$  (negative) : 535 ( $\text{M}-\text{H}$ )<sup>-</sup>

20

高分解能高速電子衝撃質量スペクトル (HRFAB-MS)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>

:

実測値：537.1018

計算値：537.1034 ( $\text{C}_{27}\text{H}_{21}\text{O}_{12}$ )

紫外可視吸収スペクトル  $\lambda_{\max}$  (メタノール中) nm ( $\epsilon$ ) :

209(34100)、223(34200)、277(19900)、340(11600)、460(25000)

赤外吸収スペクトル  $\nu_{\max}$  (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  :

3361、1698、1620、1465、1293

5

$^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm :

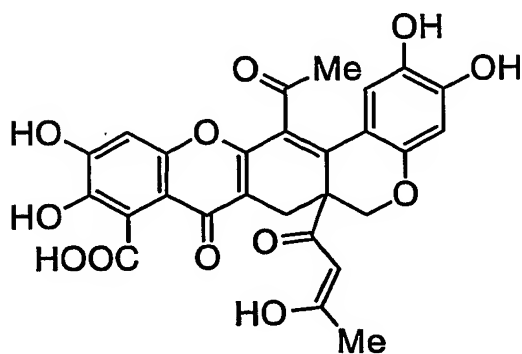
1.95(3H, s), 2.34(1H, d, 16.8), 2.63(3H, s), 3.22(1H, d, 16.8), 4.04(1H, d, 10.8), 4.51(1H, d, 10.8), 5.78(1H, s), 6.27(1H, s), 6.76(1H, s), 6.78(1H, s)

$^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm :

10 23.7, 24.4, 32.0, 50.6, 71.9, 98.4, 102.5, 104.5, 109.0, 109.3, 111.9, 112.7, 118.8, 125.0, 135.4, 141.2, 143.0, 149.7, 151.1, 152.0, 152.6, 155.8, 168.3, 172.5, 189.0, 197.0, 204.2

溶解性 : 水、ヘキサンに不溶、メタノール、DMSOに可溶

これらから SPF-3059-40 の構造式を、次式と決定した。



15

(SPF-3059-41)

外観 : 黄色粉末

物質の性質 : 酸性物質

20

分子量 : 548

分子式 :  $\text{C}_{28}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS)  $m/z$  (positive) : 5

49 (M+H)<sup>+</sup>

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (negative) : 5

47 (M-H)<sup>-</sup>

高分解能高速電子衝撃質量スペクトル (HRFAB-MS) m/z (M+H)<sup>+</sup>

5 :

実測値 : 549.1002

計算値 : 549.1034 (C<sub>28</sub>H<sub>21</sub>O<sub>12</sub>)

紫外可視吸収スペクトル λ<sub>max</sub> (メタノール中) nm (ε) :

227(30200)、282sh(13500)、315(13900)、356(11000)

10 赤外吸収スペクトル ν<sub>max</sub> (KBr) cm<sup>-1</sup> :

3396、1688、1662、1622、1470、1294

<sup>1</sup>H-NMRスペクトル :

重ジメチルスルフォキシド (DMSO-d<sub>6</sub>) 中、500MHzで測定したスペクトルを図7に示す。

15 <sup>13</sup>C-NMRスペクトル :

重ジメチルスルフォキシド (DMSO-d<sub>6</sub>) 中、125MHzで測定したスペクトルを図8に示す。

溶解性 : 水、ヘキサンに不溶、メタノール、DMSOに可溶

20 (SPF-3059-42)

外観 : 黄色粉末

分子量 : 806

分子式 : C<sub>41</sub>H<sub>26</sub>O<sub>18</sub>

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (positive) : 8

25 07 (M+H)<sup>+</sup>

高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (negative) : 8

05 (M-H)<sup>-</sup>

高分解能マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量スペクトル (HR MALDI-TOF-MS)  $m/z$  ( $M+H$ )<sup>+</sup>:

実測値: 807.1261

計算値: 807.1198 ( $C_{41}H_{27}O_{18}$ )

5 紫外可視吸収スペクトル  $\lambda_{max}$  (メタノール中) nm ( $\epsilon$ ):

221(58300)、316(28000)、353(23100)

赤外吸収スペクトル  $\nu_{max}$  (KBr)  $cm^{-1}$ :

3400、1704、1651、1620、1444、1294

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm:

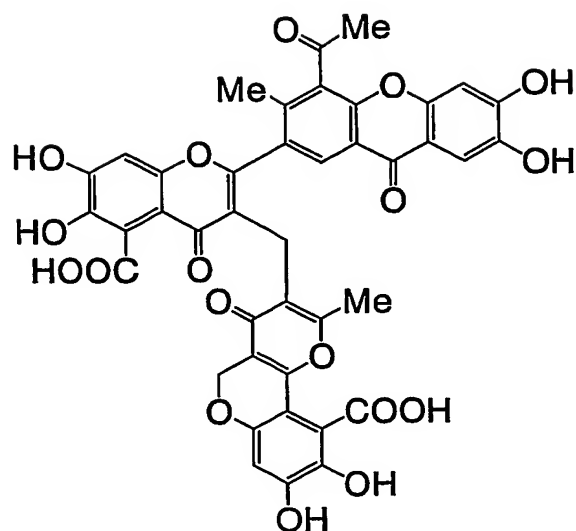
10 2.08(3H, s)、2.10(3H, s)、2.51(3H, s)、3.47(1H, d, 15.9)、3.54(1H, d, 15.9)、  
4.48(1H, d, 13.1)、4.65(1H, d, 13.1)、6.28(1H, s)、6.84(1H, s)、6.89(1H, s)、  
7.40(1H, s)、8.12(1H, s)

$^{13}C$ -NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm:

15 16.5、17.1、19.1、31.9、61.8、102.1、102.9(2C)、103.4、108.7、109.2、11  
1.5、113.5、118.5、119.1(2C)、119.7、122.0、127.8、128.9、131.2、139.1(2C)  
、141.7、144.2、150.0、154.0(2C)、150.5、150.6、150.7、152.0、152.3、158.9  
、160.9、167.8、167.9、173.1、173.3、175.0、202.5

溶解性: 水、ヘキサンに不溶、メタノール、DMSOに可溶。

これらから SPF-3059-42 の構造式を、次式と決定した。



## 実施例 2 (Sema 3 Aのコラプス活性に対する本発明の化合物の抑制作用)

- ポリリジンを塗布した96ウェルプレート(住友ベークライト)にさらにラミニン
- 5 塗布(20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のラミニン、室温1時間)を行った。各ウェルに100  $\mu\text{l}$ の  
培地(10%の牛胎仔血清、20  $\text{ng}/\text{ml}$ のNGF、100ユニット/ $\text{ml}$ のペニ  
シリン、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のストレプトマイシンを含むF12培地)を入れ、ここに  
7日齢ニワトリ胚から摘出した後根神経節を接種し、16~20時間5%  $\text{CO}_2$ 、3  
7℃の条件下で培養した。その後、対象化合物を種々の濃度で培地に添加し1時間培  
10 養後、3ユニット/ $\text{ml}$ のマウスセマフォリン3A(Sema 3 A)を添加し、更に  
1時間培養した。1時間経過後、速やかに最終濃度1%になるようにグルタルアルデ  
ヒドを添加し、室温に15分間放置して組織片を固定した後、顕微鏡下で退縮した成  
長円錐の割合を測定した。陰性対照群(化合物、Sema 3 A共に不添加)の成長円錐退  
縮割合を(A) %、陽性対照群(化合物不添加、Sema 3 A添加)の成長円錐退  
15 縮割合を(B) %、試験群(各化合物及びSema 3 A添加)の成長円錐退縮割合を(C)  
%)として、 $C = (A + B) / 2$ となる各化合物の濃度をIC50値とした。結果を  
以下に示す。この結果から、本発明の化合物は強くセマフォリンを阻害することが  
わかる。

表2

		-----	
		化合物	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)
		-----	
5	SPF-3059-8	2	
	SPF-3059-10	2	
	SPF-3059-16	0.5	
	SPF-3059-17	0.13	
	SPF-3059-18	0.063	
10	SPF-3059-19	0.5	
	SPF-3059-20	4	
	SPF-3059-22	0.5	
	SPF-3059-23	0.5	
	SPF-3059-31	0.25	
15	SPF-3059-38	0.013	
	SPF-3059-40	0.125	
	SPF-3059-41	0.25	
	SPF-3059-42	0.063	
		-----	

20

## 実施例3（本発明の化合物の塩の製造）

本発明の化合物をメタノールに溶解して1mM溶液を調製する。この溶液1m  
1に、1mM水酸化ナトリウムのメタノール溶液を、本発明の化合物が2個のカ  
ルボキシ基を持つ場合は2m1、本発明の化合物が1個のカルボキシ基を持  
25 っ場合は1m1加え、十分に混合する。この溶液を減圧下に溶媒を留去、乾燥し  
、本発明の化合物のナトリウム塩1 $\mu$ molを得る。

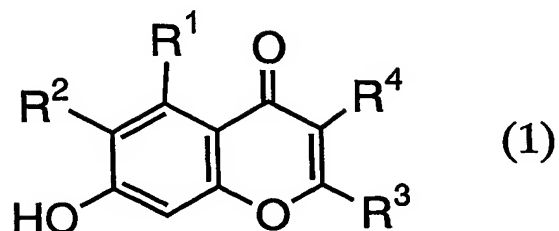
産業上の利用可能性

本発明の化合物は、セマフォリン阻害活性を有し、各種神経障害性疾患・神経変性疾患に対する予防剤や治療剤として有利に用いることができる。



## 請求の範囲

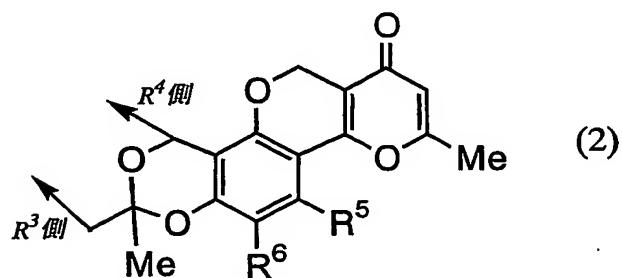
1. 一般式(1)で表される化合物、またはその薬学上許容される塩。



[式中、 $R^1$ は水素原子またはカルボキシル基を表し、 $R^2$ は水素原子または水酸基を

5 表し、 $R^3$ および $R^4$ は以下の [I] ~ [IX] のいずれかを表す。

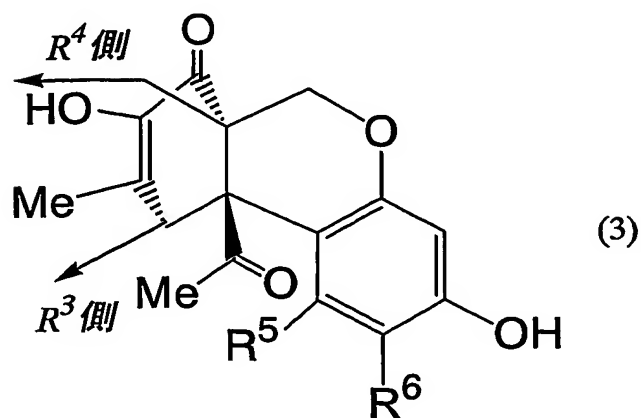
[I]  $R^3$ および $R^4$ は結合して、式(2)：



(式中、 $R^5$ は水素原子またはカルボキシル基を表し、 $R^6$ は水素原子または水酸基を表す。)

10 で表される2価基を表す。

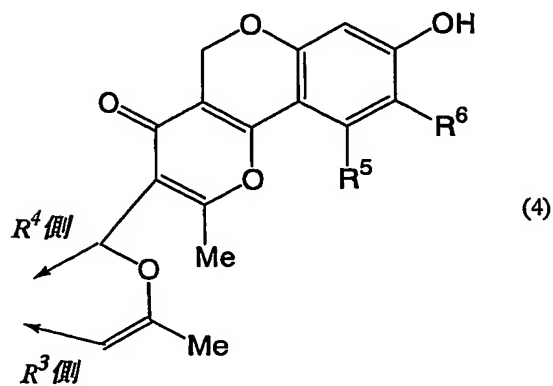
[II]  $R^3$ および $R^4$ は結合して、式(3)：



(式中、 $R^5$ および $R^6$ は前記と同義である。)

で表される2価基を表す。

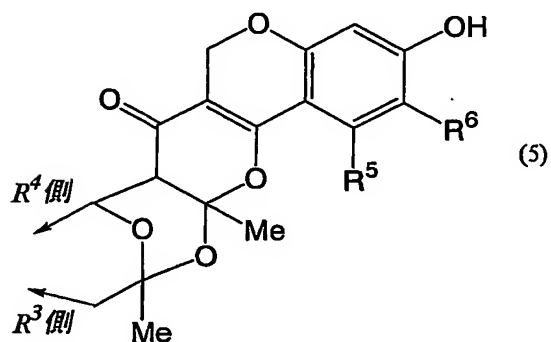
[III]  $R^3$ および $R^4$ は結合して、式(4) :



(式中、 $R^5$ および $R^6$ は前記と同義である。)

で表される2価基を表す。

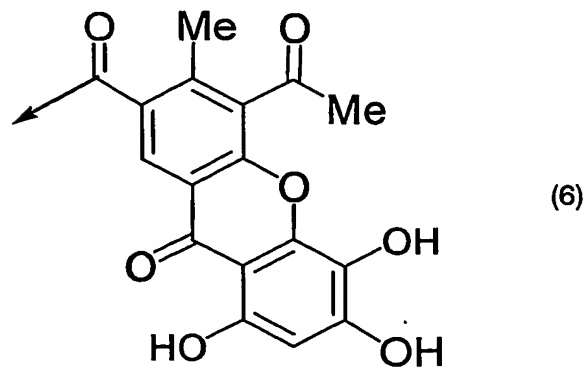
5 [IV]  $R^3$ および $R^4$ は結合して、式(5) :



[式中、 $R^5$ および $R^6$ は前記と同義である。]

で表される2価基を表す。

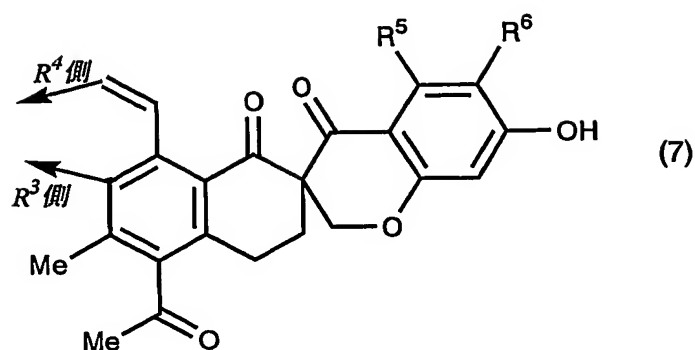
[V]  $R^3$ は水素原子を表し、 $R^4$ は式(6) :



10

で表される基を表す。

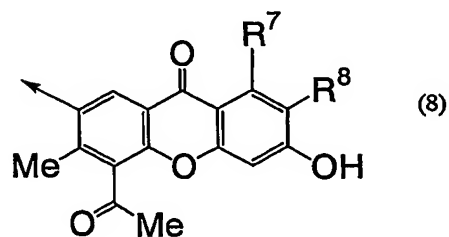
[VI]  $R^3$ および $R^4$ は結合して、式(7) :



(式中、 $R^5$ および $R^6$ は前記と同義である。)

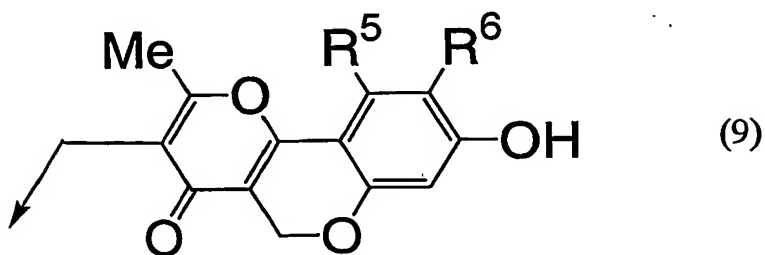
で表される2個基を表す。

[VII]  $R^3$ は式(8)：



(式中、 $R^7$ は水素原子またはカルボキシル基を表し、 $R^8$ は水素原子または水酸基を表す。)

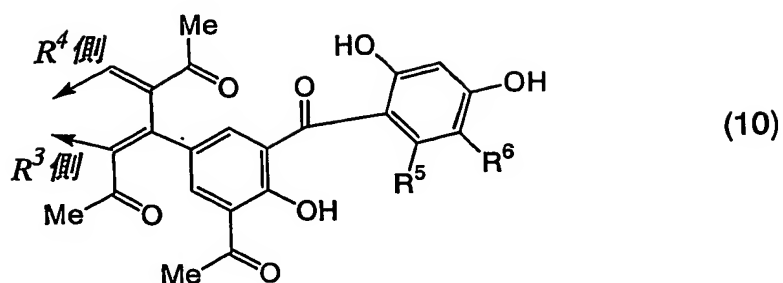
で表される基を表し、 $R^4$ は式(9)：



(式中、 $R^5$ 及び $R^6$ は前記と同義である。)

で表される基を表す。

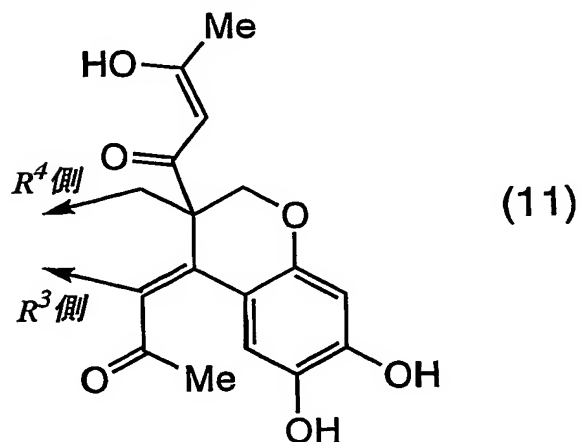
[VIII]  $R^3$ および $R^4$ は結合して、式(10)：



(式中、 $R^5$ および $R^6$ は前記と同義である。)

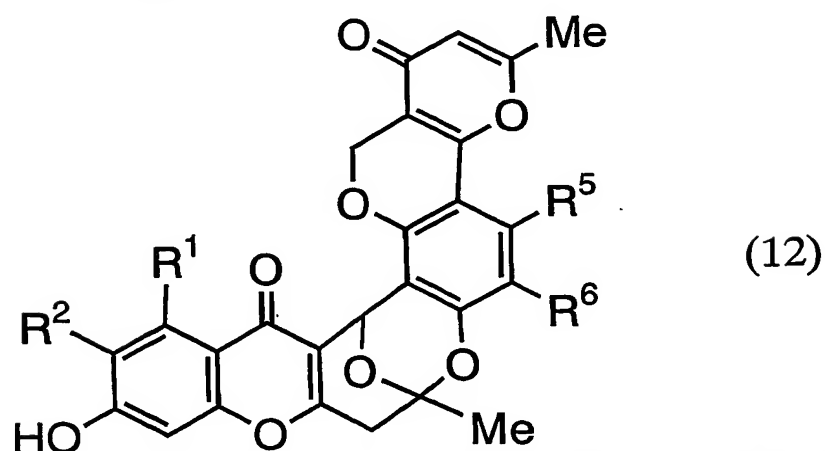
で表される2価基を表す。

[IX]  $R^3$ および $R^4$ は結合して、式(11)：



で表される2価基を表す。]

2. 一般式(12)：



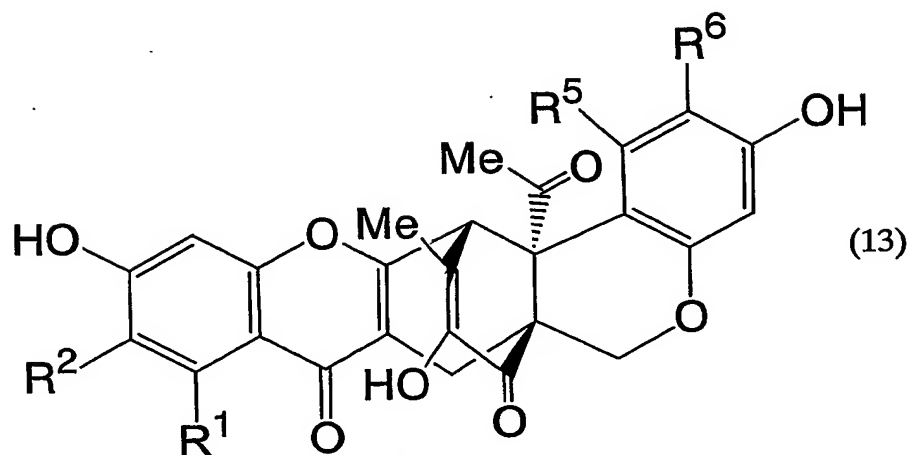
(式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$ および $R^6$ は、請求項1と同義である。)

10 で表される、請求項1記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

3. 一般式(12)において、 $R^1$ および $R^5$ が、カルボキシル基であり、 $R^2$ が水

酸基又は水素原子であり、 $R^6$ が水酸基である、請求項2記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

4. 一般式(13)：

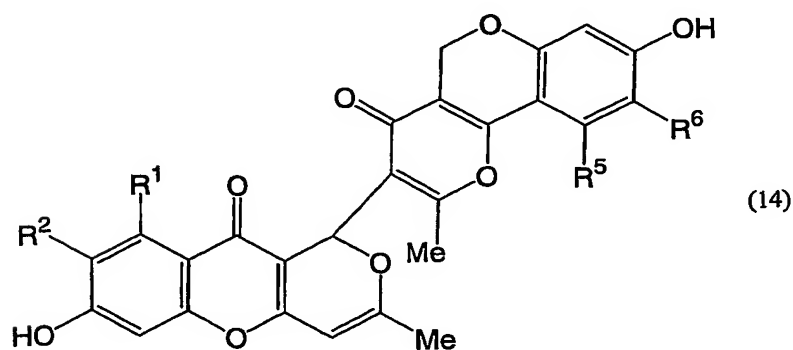


(式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$ および $R^6$ は請求項1と同義である。)

で表される、請求項1記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

5. 一般式(13)において、 $R^1$ および $R^5$ がカルボキシ基であり、 $R^2$ および $R^6$ が水酸基である、請求項4記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

10 6. 一般式(14)：



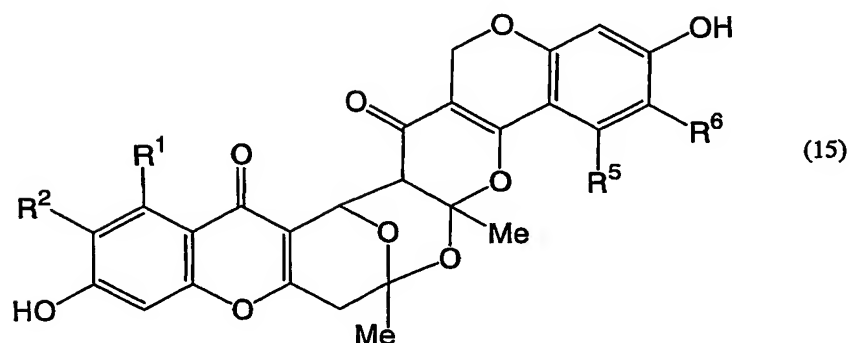
[式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$ および $R^6$ は請求項1と同義である。]

で表される請求項1記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

15 7. 一般式(14)において、 $R^1$ および $R^5$ がカルボキシ基であり、 $R^2$ および

R<sup>6</sup>が水酸基である、請求項6記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

8. 一般式(15) :



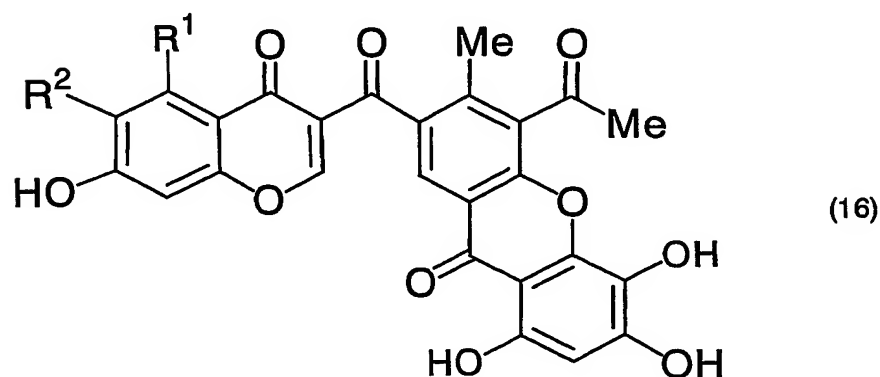
5 (式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>5</sup>およびR<sup>6</sup>は請求項1と同義である。)

で表される請求項1記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

9. 一般式(15)において、R<sup>1</sup>およびR<sup>5</sup>がカルボキシ基であり、R<sup>2</sup>およびR<sup>6</sup>が水酸基である、請求項8記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

10. 一般式(16) :

10



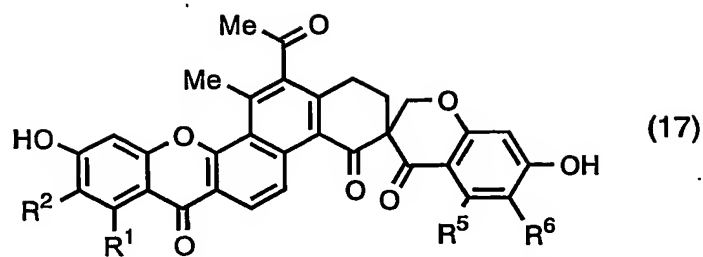
(式中、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は請求項1と同義である。)

で表される請求項1記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

11. 一般式(16)において、R<sup>1</sup>が、カルボキシ基を表し、R<sup>2</sup>が、水酸基を

15 表す請求項10記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

12. 一般式(17) :

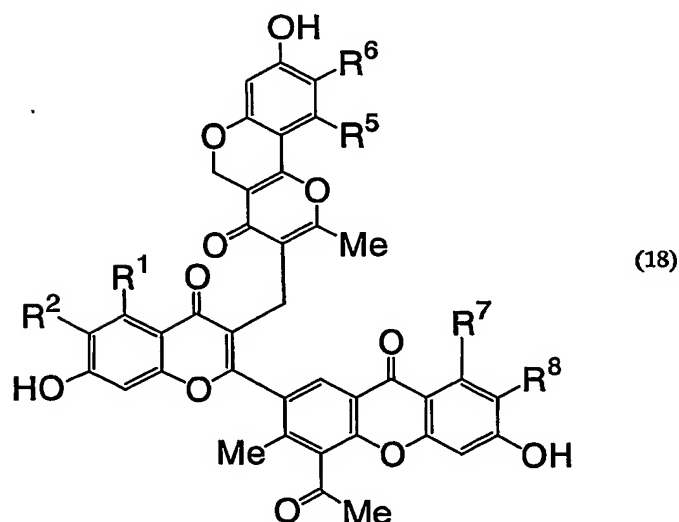


(式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$ 及び $R^6$ は、請求項1と同義である。)

で表される請求項1記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

- 5 13. 一般式(17)において、 $R^1$ および $R^5$ がカルボキシル基を表し、 $R^2$ および $R^6$ が水酸基を表す、請求項11記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

14. 一般式(18)：



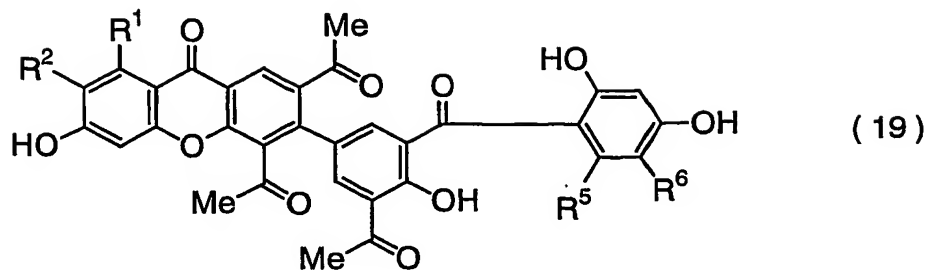
- 10 (式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ および $R^8$ は請求項1と同義である。)

で表される請求項1記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

15. 一般式(18)において、 $R^1$ および $R^5$ はカルボキシル基であり、 $R^2$ 、 $R^6$ および $R^8$ が水酸基である、請求項14記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

- 15 16. 一般式(18)において、 $R^7$ が水素原子である、請求項15記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

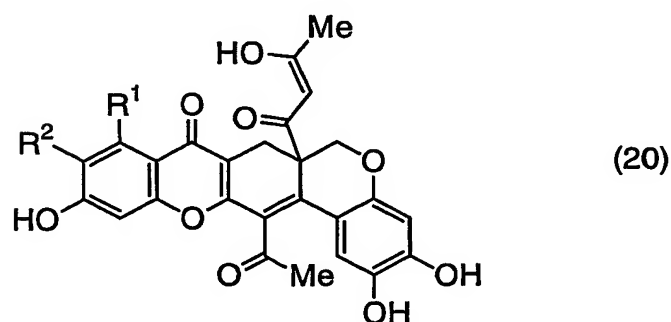
17. 一般式(19) :



(式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>5</sup>およびR<sup>6</sup>は請求項1と同義である。)

で表される請求項1記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

- 5 18. 一般式(19)において、R<sup>2</sup>およびR<sup>6</sup>が水酸基である、請求項17記載の化合物、又はその薬学上許容される塩。
19. 一般式(19)において、R<sup>5</sup>がカルボキシ基である、請求項18記載の化合物、又はその薬学上許容される塩。
20. 一般式(19)において、R<sup>1</sup>がカルボキシ基である、請求項19記載の
- 10 化合物、又はその薬学上許容される塩。
21. 一般式(20) :



(式中、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、請求項1と同義である。)

で表される請求項1記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

- 15 22. 一般式(20)において、R<sup>1</sup>がカルボキシ基であり、R<sup>2</sup>が水酸基である、請求項21記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。
23. ペニシリウム属に属するSPF-3059株より得ることができ、下記の物理的性質および化学的性質を有し、かつセマフォリン阻害活性を有する化合物。



- (a) 高速電子衝撃質量スペクトル $m/z$ 値 ( $M+H$ )<sup>+</sup>: 545 ;  
(b) 分子式:  $C_{28}H_{16}O_{12}$  ;  
(c) 紫外可視吸収スペクトル $\lambda_{max}$  (メタノール中) nm ( $\epsilon$ ) : 213(41700)、286(29500)、338sh(14900)、429sh(6500) ;

5 (d) 赤外吸収スペクトル $\nu_{max}$  (KBr)  $cm^{-1}$  : 3358、3073、1700、1674、1631、1464、1276、1248 ;

(e)  $^1H$ 核磁気共鳴スペクトル(DMSO-d<sub>6</sub>中、500MHz) : スペクトルのチャートを第1図に示す ;

10 (f)  $^{13}C$ 核磁気共鳴スペクトル(DMSO-d<sub>6</sub>中、125MHz) : スペクトルのチャートを第2図に示す ;

24. ペニシリウム属に属するSPF-3059株より得ることができ、下記の物理的性質および化学的性質を有し、かつセマフォリン阻害活性を有する化合物。

(a) 高速電子衝撃質量スペクトル $m/z$ 値 ( $M+H$ )<sup>+</sup>: 561 ;

(b) 分子式:  $C_{28}H_{16}O_{13}$  ;

15 (c) 紫外可視吸収スペクトル $\lambda_{max}$  (メタノール中) nm ( $\epsilon$ ) : 219(34300)、257(28900)、311(28600)、404(14600)、450(14400) ;

(d) 赤外吸収スペクトル $\nu_{max}$  (KBr)  $cm^{-1}$  : 3154、1657、1605、1468、1279 ;

20 (e)  $^1H$ 核磁気共鳴スペクトル(DMSO-d<sub>6</sub>中、500MHz) : スペクトルのチャートを第3図に示す ;

(f)  $^{13}C$ 核磁気共鳴スペクトル(DMSO-d<sub>6</sub>中、125MHz) : スペクトルのチャートを第4図に示す ;

25. ペニシリウム属に属するSPF-3059株より得ることができ、下記の物理的性質および化学的性質を有し、かつセマフォリン阻害活性を有する化合物。

25 (a) 高速電子衝撃質量スペクトル $m/z$ 値 ( $M+H$ )<sup>+</sup>: 669 ;

(b) 分子式:  $C_{34}H_{20}O_{15}$  ;

(c) 紫外可視吸収スペクトル $\lambda_{max}$  (メタノール中) nm ( $\epsilon$ ) : 213(5460

0)、235sh(39400)、312(31300)、350(24200) ;

(d) 赤外吸収スペクトル $\nu_{\max}$  (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  : 3348、1766、1707、1644、1588、1464、1301 ;

5 (e)  $^1\text{H}$ 核磁気共鳴スペクトル(DMSO-d6中、500MHz) : スペクトルのチャート  
トを第5図に示す ;

(f)  $^{13}\text{C}$ 核磁気共鳴スペクトル(DMSO-d6中、125MHz) : スペクトルのチャート  
トを第6図に示す ;

26. ペニシリウム属に属するSPF-3059株より得ることができ、下記の物理的性質  
および化学的性質を有し、かつセマフォリン阻害活性を有する化合物。

10 (a) 高速電子衝撃質量スペクトル $m/z$ 値 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^{+}$  : 549 ;

(b) 分子式 :  $\text{C}_{28}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$  ;

(c) 紫外可視吸収スペクトル $\lambda_{\max}$  (メタノール中) nm ( $\epsilon$ ) : 227(30200)、282sh(13500)、315(13900)、356(11000) ;

15 (d) 赤外吸収スペクトル $\nu_{\max}$  (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  : 3396、1688、1662、1622、1470、1294 ;

(e)  $^1\text{H}$ 核磁気共鳴スペクトル(DMSO-d6中、500MHz) : スペクトルのチャート  
トを第7図に示す ;

(f)  $^{13}\text{C}$ 核磁気共鳴スペクトル(DMSO-d6中、125MHz) : スペクトルのチャート  
トを第8図に示す ;

20 27. 請求項1～26のいずれか記載の化合物、またはその薬学上許容される塩を  
有効成分として含有することを特徴とするセマフォリン阻害剤。

28. セマフォリンが、クラス3型セマフォリンであることを特徴とする、請求項  
27記載のセマフォリン阻害剤。

25 29. クラス3型セマフォリンが、セマフォリン3Aであることを特徴とする、請  
求項28記載のセマフォリン阻害剤。

30. 請求項27～29のいずれか記載のセマフォリン阻害剤を有効成分として含  
有することを特徴とする、神経伸長反発因子阻害剤。

31. 請求項27～29のいずれか記載のセマフォリン阻害剤を有効成分として含有することを特徴とする、成長円錐退縮活性及び／又はコラーゲンゲル中での神経伸長阻害活性の抑制作用を有する薬剤。

5 32. 請求項27～29のいずれか記載のセマフォリン阻害剤を有効成分として含有することを特徴とする、神経再生促進剤。

33. 請求項27～29のいずれか記載のセマフォリン阻害剤を有効成分として含有することを特徴とする神経障害疾患及び／又は神経変性疾患の予防若しくは治療剤。

10 34. 請求項27～29のいずれか記載のセマフォリン阻害剤を有効成分として含有することを特徴とする、脊髄神経の損傷及び／又は末梢神経の損傷を伴う疾患の予防若しくは治療剤。

15 35. 請求項27～29のいずれか記載のセマフォリン阻害剤を有効成分として含有することを特徴とする、嗅覚異常症、外傷性神経傷害、脳梗塞性神経障害、顔面神経麻痺、糖尿病性神経症、緑内障、網膜色素変性症、アルツハイマー病、パーキンソン病、神経変性疾患、筋發育不全性側索硬化症、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、脳梗塞、又は外傷性神経変性疾患の予防若しくは治療剤。

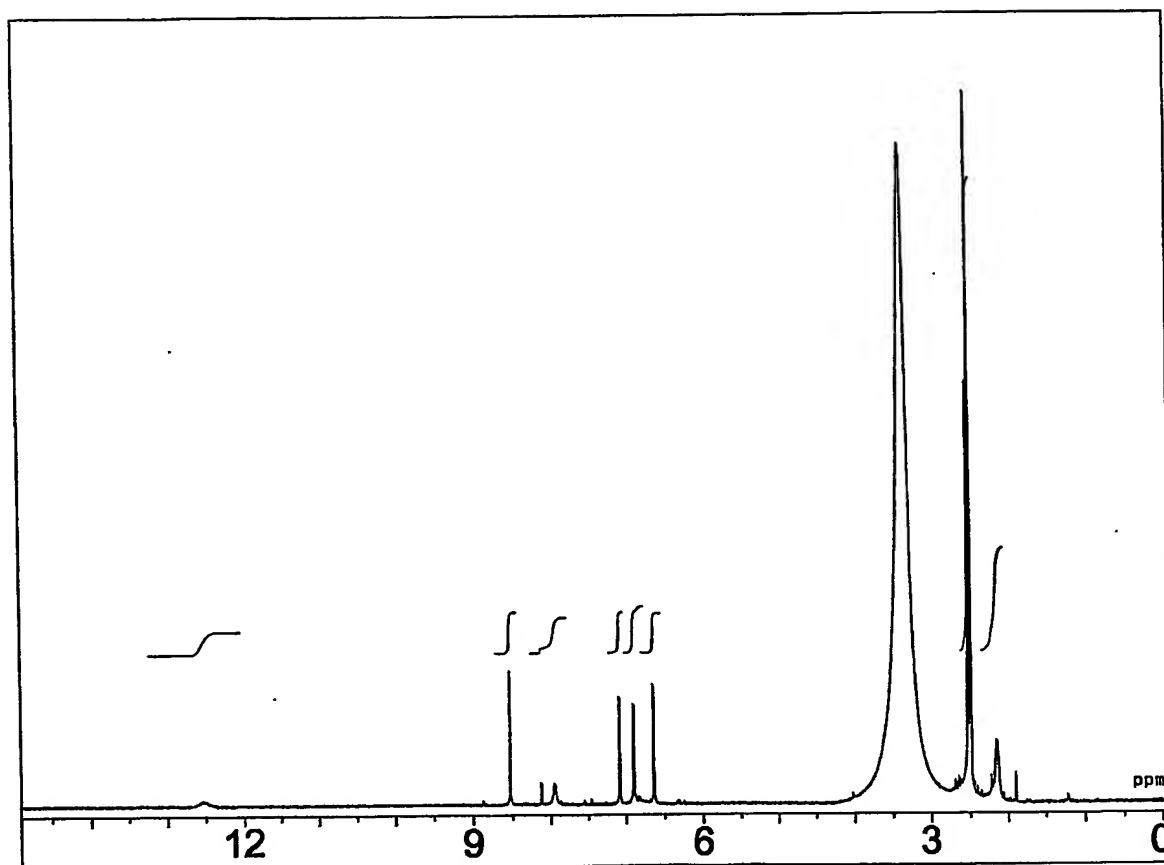
36. ペニシリウム属に属する微生物を培養して、その培養物から化合物を採取することを特徴とする、請求項1～26のいずれか記載の化合物、またはその薬学上許容される塩の製造方法。

20 37. ペニシリウム属に属する微生物が、ペニシリウム・エスピー (Penicillium sp.) S P F - 3 0 5 9 株であることを特徴とする請求項36記載の製造方法。

1/8

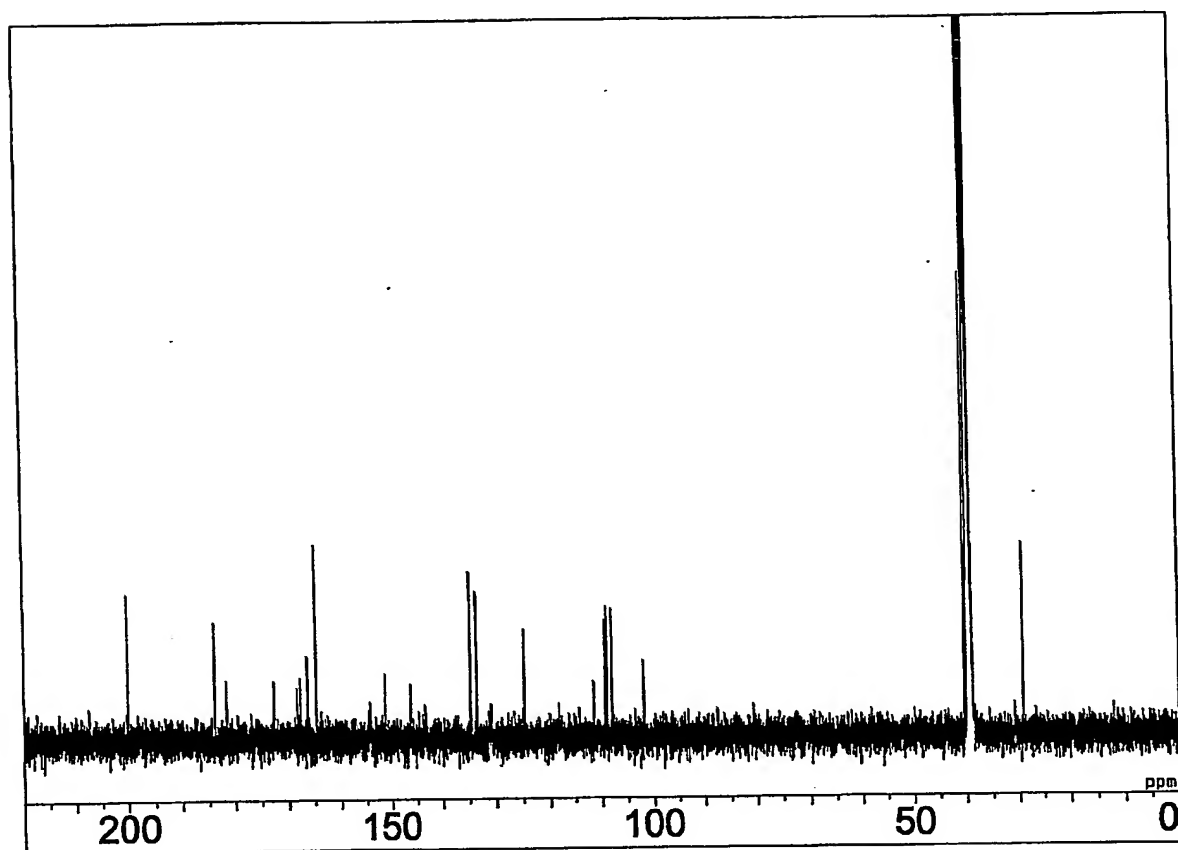
図 面

第1図



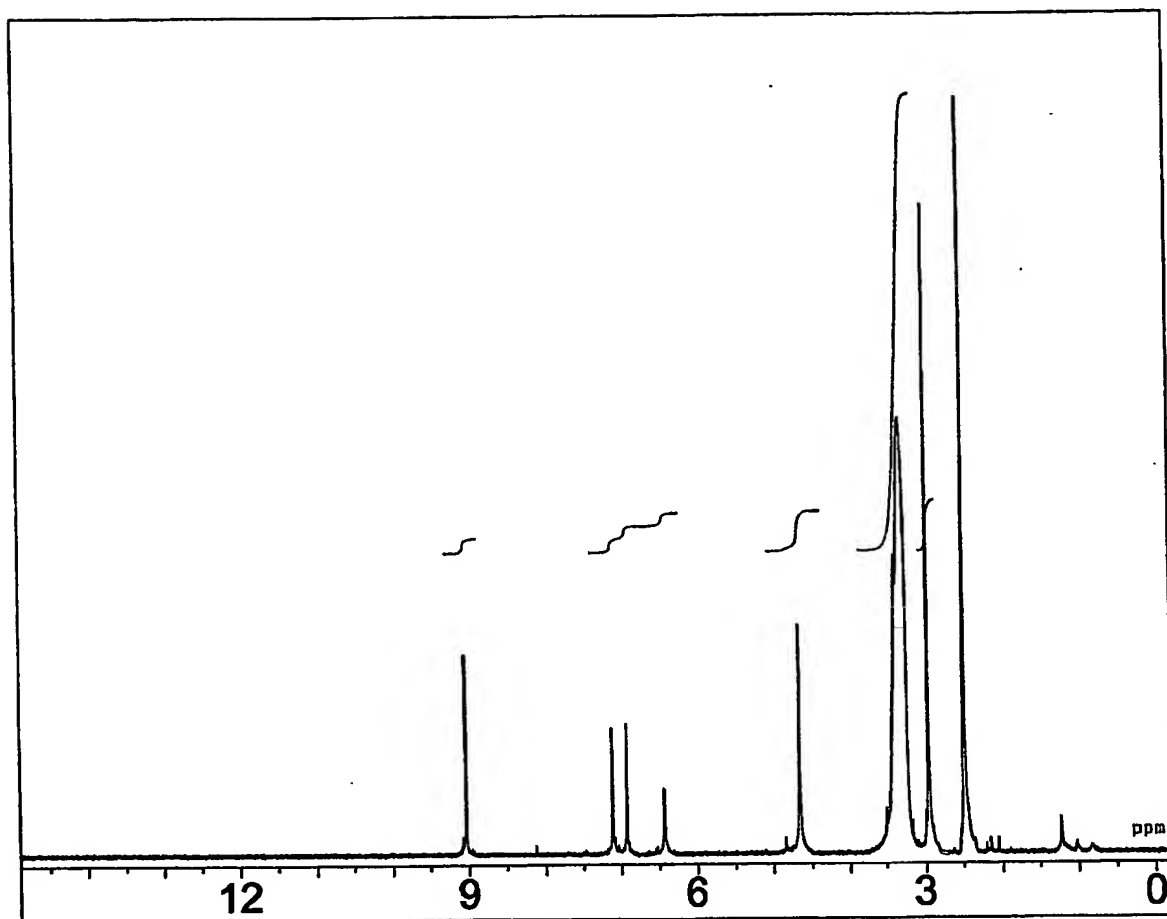
2/8

第2図



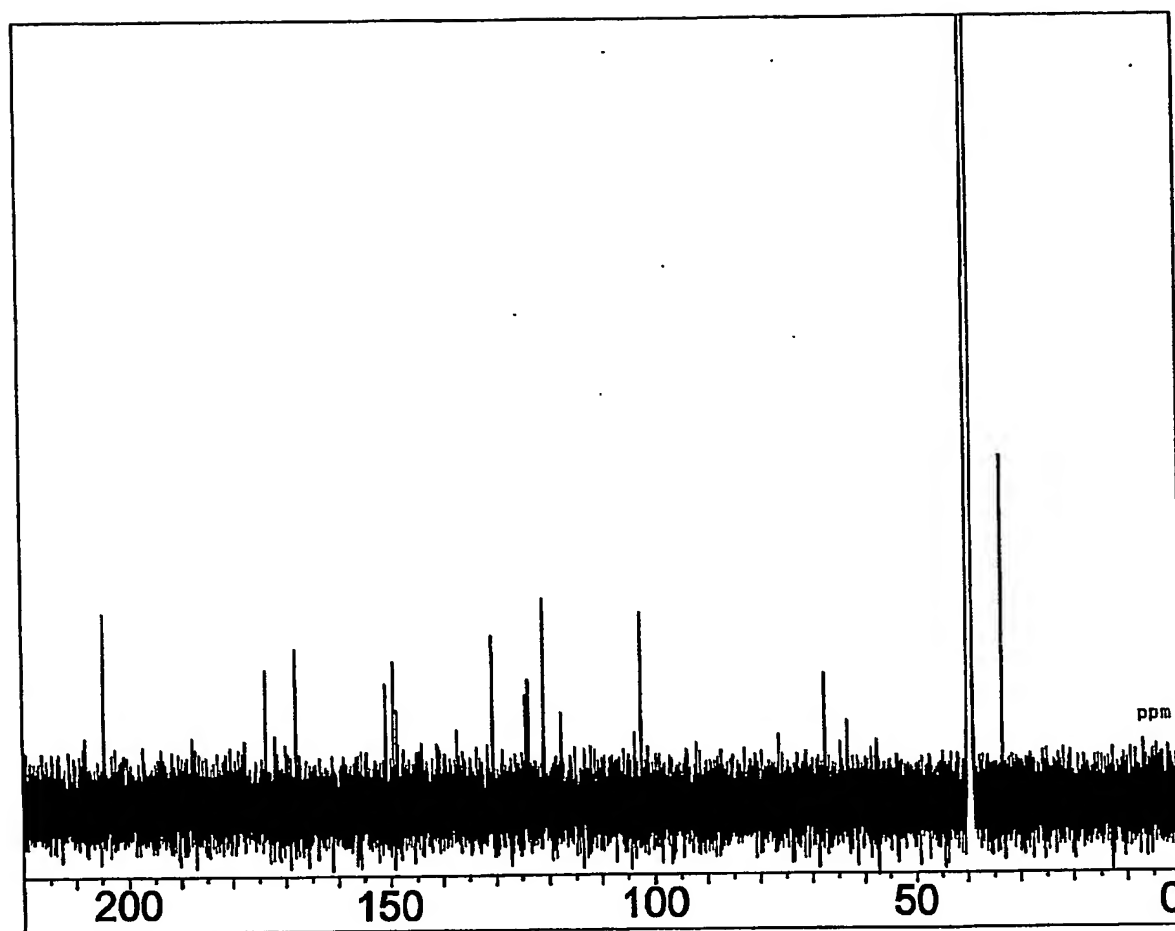
3/8

第3図



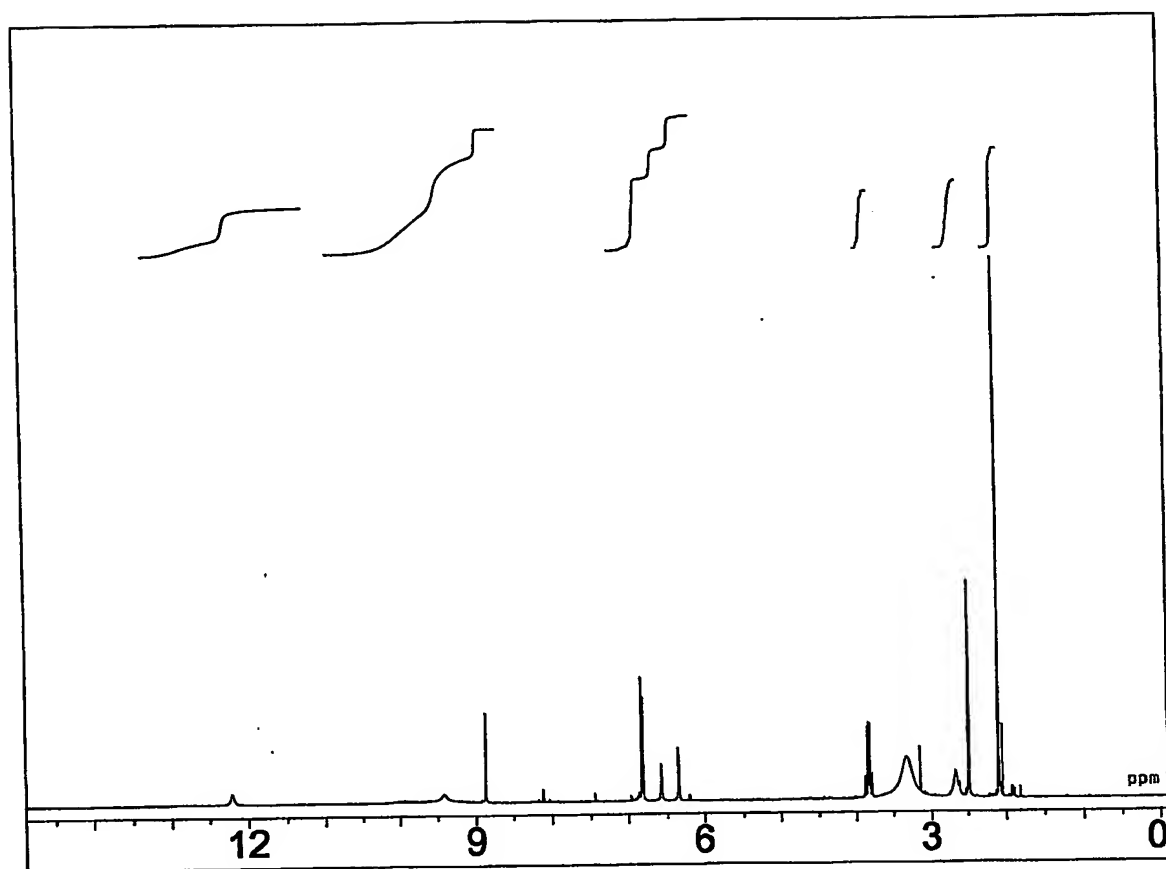
4/8

第4図



5/8

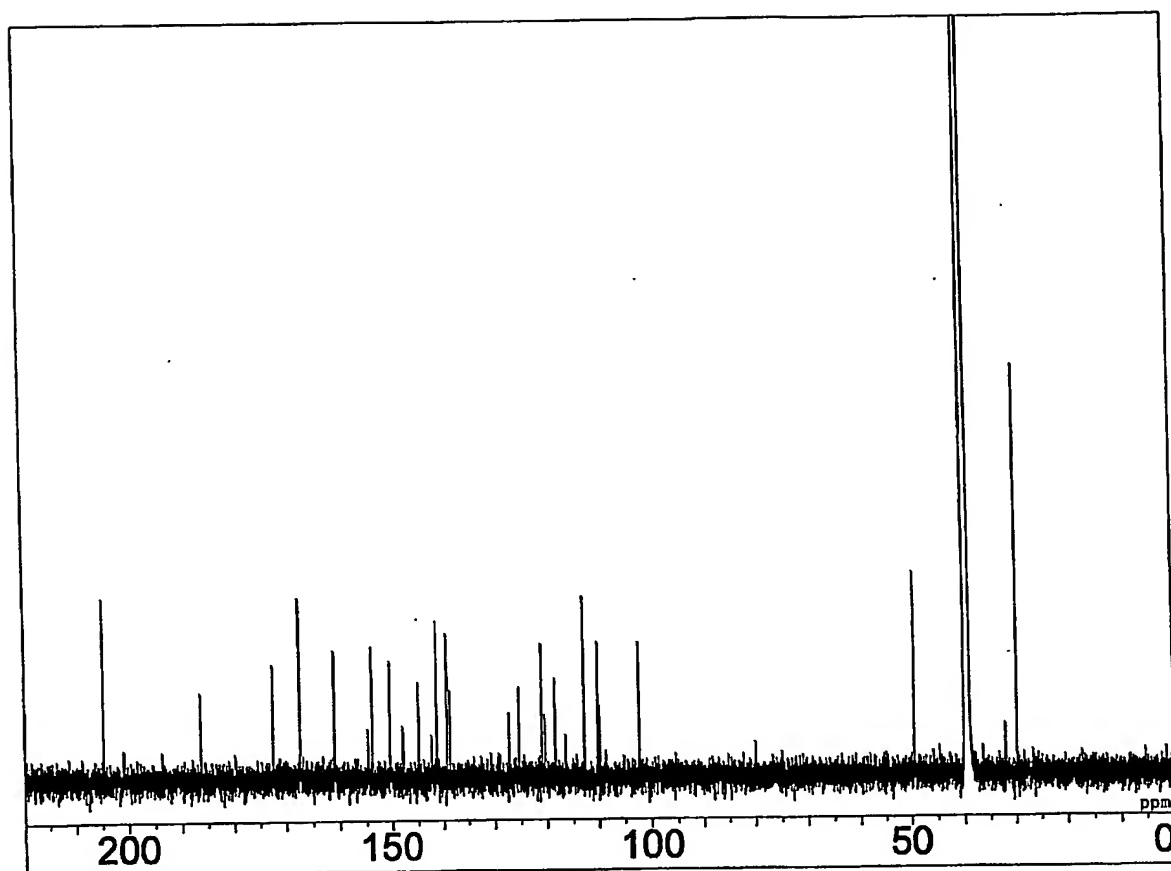
第5図





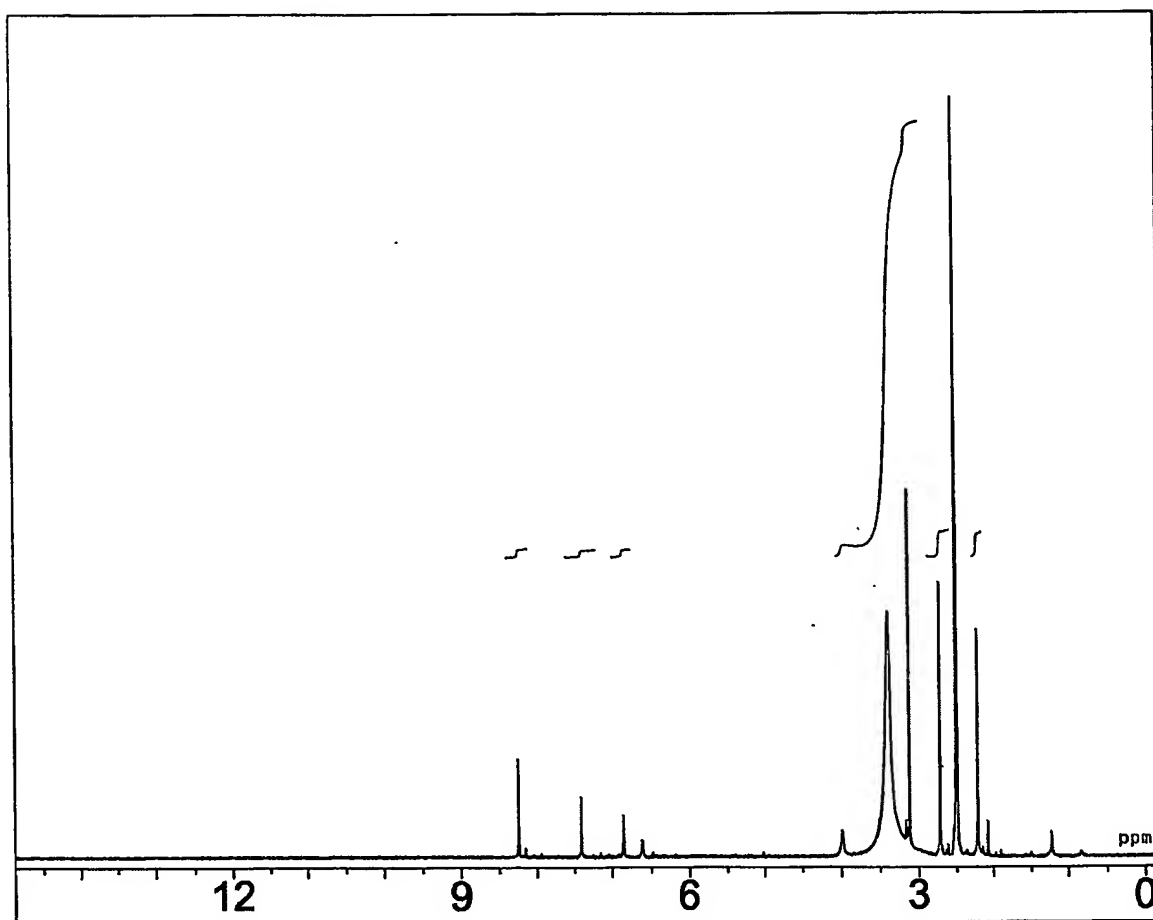
6 / 8

第6図



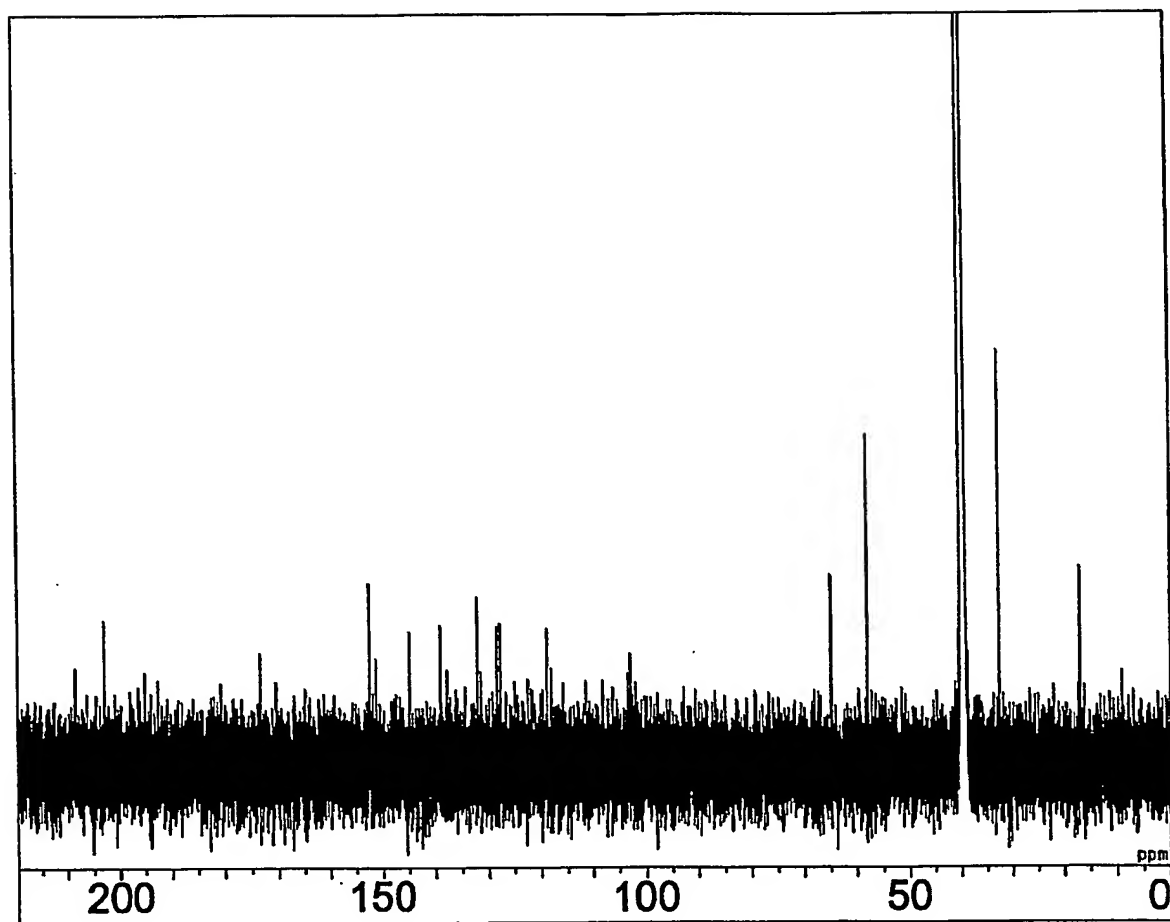
7/8

第7図



8/8

第8図



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Classification No.

PCT/JP03/00567

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C07D493/22, 311/86, 493/04, 493/08, 493/10, A61K31/35,  
31/352, A61P9/10, 25/00, 25/14, 25/16, 25/28, 27/06,  
43/00, C12P17/18 // C07M7:00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C07D493/22, 311/86, 493/04, 493/08, 493/10, A61K31/35,  
31/352, A61P9/10, 25/00, 25/14, 25/16, 25/28, 27/06,  
43/00, C12P17/18 // C07M7:00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN), BIOSIS/WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5416197 A (TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA), 16 May, 1995 (16.05.95), Full text (Family: none)	1-3, 27-37
A	WO 98/15628 A1 (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), 16 April, 1998 (16.04.98), Full text & EP 945505 A1 & JP 10-517376 A	1-3, 27-37
A	WO 98/11216 A1 (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), 19 March, 1998 (19.03.98), Full text & EP 960937 A1 & JP 10-513487 A	1-3, 27-37

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
07 May, 2003 (07.05.03)

Date of mailing of the international search report  
20 May, 2003 (20.05.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP03/00567

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GOSHIMA Y. et al., Functions of semaphorins in axon guidance and neuronal regeneration, Jpn.J. Pharmacol., 2000, 82(4), p.273-9	1-3,27-37
P,A	WO 02/09756 A1 (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), 07 February, 2002 (07.02.02), Full text (Family: none)	1-3,27-37

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP03/00567

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

(See extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
Parts of claims 1-3, 27-37 relating to compounds of the general formula (1) wherein  $R^3$  and  $R^4$  are groups represented by formula [I].

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

A. The claims are classified into the following groups of inventions:

- [1] parts relating to compounds of the general formula (1) wherein  $R^3$  and  $R^4$  are groups represented by formula [I] (claims 1-3, 27-37),
- [2] parts relating to compounds of the general formula (1) wherein  $R^3$  and  $R^4$  are groups represented by formula [II] (claims 1, 4-5, 27-37),
- [3] parts relating to compounds of the general formula (1) wherein  $R^3$  and  $R^4$  are groups represented by formula [III] (claims 1, 6-7, 27-37),
- [4] parts relating to compounds of the general formula (1) wherein  $R^3$  and  $R^4$  are groups represented by formula [IV] (claims 1, 8-9, 27-37),
- [5] parts relating to compounds of the general formula (1) wherein  $R^3$  and  $R^4$  are groups represented by formula [V] (claims 1, 10-11, 27-37),
- [6] parts relating to compounds of the general formula (1) wherein  $R^3$  and  $R^4$  are groups represented by formula [VI] (claims 1, 12-13, 27-37),
- [7] parts relating to compounds of the general formula (1) wherein  $R^3$  and  $R^4$  are groups represented by formula [VII] (claims 1, 14-16, 27-37),
- [8] parts relating to compounds of the general formula (1) wherein  $R^3$  and  $R^4$  are groups represented by formula [VIII] (claims 1, 17-20, 27-37),
- [9] parts relating to compounds of the general formula (1) wherein  $R^3$  and  $R^4$  are groups represented by formula [IX] (claims 1, 21-22, 27-37),
- [10] parts relating to compounds of claim 23 (claims 23, 27-37),
- [11] parts relating to compounds of claim 24 (claims 24, 27-37),
- [12] parts relating to compounds of claim 25 (claims 25, 27-37), and
- [13] parts relating to compounds of claim 26 (claims 26-37).

The matter common to the above groups of inventions is a compound represented by the general formula (1).

As a result of search, however, compounds represented by the general formula (1) are disclosed in JP 59-108778 A. Therefore, the above common matter has been disclosed in the above document, thus being not novel.

Thus, the common matter is still a matter of prior art and is not a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2, second sentence.

Accordingly, there is no matter common to all of the claims. Further, there is no other common matter considered as a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2, second sentence, and no technical relationship within the meaning of PCT Rule 13 can be found among those inventions.

Such being the case, the groups of inventions do not comply with the requirement of unity of invention.

B. The invention first mentioned in the claims corresponds to parts of claims 1-3, 27-37 relating to compounds of the general formula (1) wherein  $R^3$  and  $R^4$  are groups represented by formula [I].

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07D493/22, 311/86, 493/04, 493/08, 493/10, A61K31/35, 31/352, A61P9/10, 25/00, 25/14, 25/16, 25/28, 27/06, 43/00, C12P17/18 // C07M7:00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07D493/22, 311/86, 493/04, 493/08, 493/10, A61K31/35, 31/352, A61P9/10, 25/00, 25/14, 25/16, 25/28, 27/06, 43/00, C12P17/18 // C07M7:00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
CA(STN), REGISTRY(STN), BIOSIS/WPI(DIALOG), JSTPlus(JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	US 5416197 A(TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 1995.05.16, 全文(ファミリーなし)	1-3, 27-37
A	WO 98/15628 A1(住友製薬株式会社)1998.04.16, 全文 & EP 945505 A1 & JP 10-517376 A	1-3, 27-37
A	WO 98/11216 A1(住友製薬株式会社)1998.03.19, 全文 & EP 960937 A1 & JP 10-513487 A	1-3, 27-37

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.05.03

国際調査報告の発送日

20.05.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子



4B

3131

電話番号 03-3581-1101 内線 3447



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	GOSHIMA Y. et al., Functions of semaphorins in axon guidance and neuronal regeneration Jpn. J. Pharmacol., 2000, 82(4), p. 273-9	1-3, 27-37
PA	WO 02/09756 A1 (住友製薬株式会社) 2002. 02. 07, 全文 (ファミリーなし)	1-3, 27-37

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

特別ページ参照。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。  
請求の範囲1-3, 27-37のうち、本願の一般式(1)で表される化合物のR<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>が本願の[I]  
で表される化合物に係る部分

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

A. 請求項は次の発明群に分けられる。

- ①本願の一般式(1)で表される化合物の $R^3$ および $R^4$ が本願の[I]で表される化合物に係る部分(請求の範囲1-3, 27-37)
  - ②上記(1)で表される化合物の $R^3$ および $R^4$ が本願の[II]で表される化合物に係る部分(請求の範囲1, 4-5, 27-37)
  - ③上記(1)で表される化合物の $R^3$ および $R^4$ が本願の[III]で表される化合物に係る部分(請求の範囲1, 6-7, 27-37)
  - ④上記(1)で表される化合物の $R^3$ および $R^4$ が本願の[IV]で表される化合物に係る部分(請求の範囲1, 8-9, 27-37)
  - ⑤上記(1)で表される化合物の $R^3$ および $R^4$ が本願の[V]で表される化合物に係る部分(請求の範囲1, 10-11, 27-37)
  - ⑥上記(1)で表される化合物の $R^3$ および $R^4$ が本願の[VI]で表される化合物に係る部分(請求の範囲1, 12-13, 27-37)
  - ⑦上記(1)で表される化合物の $R^3$ および $R^4$ が本願的[VII]で表される化合物に係る部分(請求の範囲1, 14-16, 27-37)
  - ⑧上記(1)で表される化合物の $R^3$ および $R^4$ が本願的[VIII]で表される化合物に係る部分(請求の範囲1, 17-20, 27-37)
  - ⑨上記(1)で表される化合物の $R^3$ および $R^4$ が本願的[IX]で表される化合物に係る部分(請求の範囲1, 21-22, 27-37)
  - ⑩請求の範囲23に係る化合物に係る部分(請求の範囲23, 27-37)
  - ⑪請求の範囲24に係る化合物に係る部分(請求の範囲24, 27-37)
  - ⑫請求の範囲25に係る化合物に係る部分(請求の範囲25, 27-37)
- 及び
- ⑬請求の範囲26に係る化合物に係る部分(請求の範囲26-37)

上記発明群に共通の事項は、上記(1)で表される化合物であると認められる。

しかし、調査の結果、JP 59-108778 Aには、上記(1)で表される化合物が開示されているので、上記共通事項は、前記文献に記載されており、新規でないことが明らかとなった。

即ち、上記共通事項は先行技術の域を出ないので、PCT規則13.2の第2文の意味における特別な技術的特徴ではない。

それ故、請求の範囲全てに共通の事項はない。PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の共通の事項は存在しないので、それらの相違する発明の間にPCT規則13の意味における技術的な関連を見いだすことはできない。

よって、上記発明群は単一性の要件を満たしていない。

B. 請求の範囲に最初に記載されている発明に係る部分は、請求の範囲1-3, 27-37のうち、上記(1)で表される化合物の $R^3$ および $R^4$ が本願的[I]で表される化合物に係る部分である。